

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
ALLERGENWIRKSAMEN BESTANDTEILE DER
CHIRONOMIDEN (ZUCKMÜCKEN) UND IHRE
BEDEUTUNG FÜR DIE PATHOGENESE
VON ASTHMA BRONCHIALE**

HUGO PRELICZ

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0104

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. G. Riecker

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ALLERGENWIRKSAMEN BESTANDTEILE DER
CHIRONOMIDEN (ZUCKMÜCKEN) UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE
PATHOGENESE VON ASTHMA BRONCHIALE

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hugo Prelicz

aus

Gura-Humora

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. X. Baur

Prof. Dr. J. Ring

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. G. Riecker

Prof. Dr. G. Fruhmann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 1986

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. G. Fruhmann für die freundliche Überlassung des Themas, die Arbeitsmöglichkeit im Forschungslabor der Pneumologischen Abteilung Medizinischen Klinik I, Klinikum Großhadern und für die Unterstützung, die er mir und dieser Arbeit gewährte;

Herrn Priv. Doz. Dr. med. X. Baur, dessen stetes Interesse und unermüdliches Engagement den Fortgang dieser Arbeit wesentlich unterstützt haben;

Herrn Dr. rer. nat. M. Dewair für die Einführung in das experimentelle Arbeiten sowie für viele Anregungen und wertvolle Mithilfe bei der Lösung zahlreicher Probleme;

Frau B. Jarosch für ihre ausgezeichnete Assistenz bei vielen Versuchen.

Liste der Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
C.	Chironomus
CIE	gekreuzte Immunelektrophorese (crossed immunoelectrophoresis)
CRIE	gekreuzte Radio-Immunelektrophorese (crossed radioimmunoelectrophoresis)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
NaN ₃	Natriumazid
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
RAST	Radio-Allergo-Sorbens-Test
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan

Inhalt

- 0. Liste der Abkürzungen
- 1. Einleitung
- 2. Patientengut, Material und Methoden
 - 2.1. Kollektiv der untersuchten Personen
 - 2.2. Methodik
 - 2.2.1. Gewinnung und Auftrennung der Allergene
 - 2.2.1.1. Fraktionierung der Rohextrakte
 - 2.2.1.1.1. Ammoniumsulfat-Fällung
 - 2.2.1.1.2. Gelchromatographie
 - 2.2.1.1.3. Diskelektrophoretische Analyse
 - 2.2.2. Methoden der Allergiediagnostik
 - 2.2.2.1. RAST
 - 2.2.2.2. RAST-Inhibition
 - 2.2.2.3. Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony
 - 2.2.2.4. Immunelektrophoretische Techniken
 - 2.2.2.4.1. Gewinnung von Kaninchen-Antiseren gegen Chironomiden-Antigene
 - 2.2.2.4.2. Isolierung der Immunglobulinfraktion aus Kaninchenserum
 - 2.2.2.4.3. Vorbereitung der Gelplatten, Waschen, Färben und Entfärben
 - 2.2.2.4.4. Immunelektrophorese nach Grabar und Williams
 - 2.2.2.4.5. Gekreuzte Immunelektrophorese (CIE)
 - 2.2.2.4.6. Gekreuzte Radio-Immunelektrophorese (CRIE)
 - 2.2.2.5. Immunoblot
- 3. Ergebnisse
 - 3.1. Isolierung und Charakterisierung der Chironomiden-Allergene
 - 3.1.1. Rohextrakte von Larven, Puppen und Imagines verschiedener Chironomiden-Arten
 - 3.1.1.1. Orientierende Charakterisierung der Extrakte
 - 3.1.1.2. Allergenaktivität der Extrakte von Larven, Puppen und Imagines
 - 3.1.1.3. Immunologische Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Chironomiden-Arten
 - 3.1.1.3.1. Menschliche Seren gegen C. thummi-Larven
 - 3.1.1.3.2. Tierische Antiseren gegen Larvenrohextrakt und Gesamt-Hämoglobin von C. thummi
 - 3.1.2. Diskelektrophorese verschiedener Larvenrohextrakte der Chironomiden
 - 3.1.3. Verhalten der Antigenaktivität der Chironomiden-Extrakte während der Metamorphose am Beispiel von C. tentans
 - 3.1.3.1. Fraktionierung der Larven- und Imaginesrohextrakte von C. tentans auf Sephadex G 75 superfine
 - 3.1.3.2. Allergenaktivität der einzelnen Fraktionen

- 3.1.3.3. Immunologische Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien
- 3.2. Darstellung des individuellen Antikörpermusters mittels Allergoprint-Techniken
- 3.2.1. Gekreuzte Immunelektrophorese und gekreuzte Radio-Immunelektrophorese
- 3.2.2. Immunoblot
- 4. Diskussion
- 4.1. Zur Methodik
- 4.1.1. RAST und RAST-Inhibitionstest
- 4.1.2. Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony
- 4.1.3. Immunelektrophorese nach Grabar
- 4.1.4. Vergleich zwischen gekreuzter Radio-Immunelektrophorese und Immunoblot
- 4.2. Besprechung der Ergebnisse
- 5. Zusammenfassung
- 6. Literatur
- 7. Lebenslauf

1. Einleitung

Klinische Untersuchungen und experimentelle Forschungen haben in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Insektenallergie wichtige und neue Erkenntnisse gebracht. Unter anderem berichtete unsere Arbeitsgruppe über die Entdeckung weitverbreiteter, aggressiver Inhalationsallergene: Hämoglobine der Chironomiden (Zuckmücken) (4, 5, 6, 7, 8, 9, 46, 48, 49). Durch den Nachweis spezifischer IgE-Antikörper gegen die in der Hämolymphe der Chironomiden befindlichen, nicht zellgebundenen Hämoglobine gelang es, die bereits klinisch vermutete Typ-I-Sensibilisierung zu sichern. Es handelte sich überwiegend um Beschäftigte von Fischfutter-Firmen oder Zoohandlungen, Fischhalter, welche mit Chironomiden-Larven, einem weitverbreiteten Fischfutter Kontakt hatten. Darüber hinaus waren Insekten-Forscher und Bewohner wasserreicher Gegenden, so Bewohner der Nilregion des Sudan oder eines Seengebiets in Wisconsin (USA) betroffen (20, 23, 24, 25, 32, 33, 34, 40, 52, 58, 66). Exposition gegenüber Larven z.B. im Rahmen der täglichen Fischfütterung oder während der Chironomiden-Schwärzzeit führten bei diesen Probanden zu Überempfindlichkeitsreaktionen, die bis zu schweren Asthmaanfällen und anaphylaktischen Schockzuständen reichten. Bemerkenswert ist, daß gleichartige Krankheitserscheinungen sowohl von Bestandteilen der Chironomiden-Larven als auch der adulten Mücken (Imagines) hervorgerufen werden und daß die verschiedenen Chironomiden unter entwicklungsgeschichtlichem Aspekt z.T. weit voneinander entfernt sind.

Aufgabe dieser Arbeit war es, mit verschiedenen Methoden zu

untersuchen, ob zwischen den zahlreichen, weltweit verbreiteten Chironomiden-Arten eine immunologische Kreuzreaktion besteht, ggf. sollten kreuzreagierende Bestandteile identifiziert werden:

Dabei gingen wir folgendermaßen vor:

1. Extraktion der Allergene aus Larven, Puppen und Imagines verschiedener Chironomiden-Arten.
2. Prüfung der Ag-Aktivität und der immunologischen Kreuzreaktion der erhaltenen Extrakte mittels RAST und RAST-Inhibition unter Verwendung von Seren sensibilisierter Probanden.
3. Anwendung neuer immunologischer Techniken unter Einsatz menschlicher und tierischer Antiseren gegen Chironomiden-Antigene.

Vorab erscheint es zum besseren Verständnis sinnvoll, einige Daten über die Chironomiden aus der Biologie und Ökologie zu erwähnen. Die Familie der Chironomiden stellt mit über 10.000 verschiedenen Arten eine der größten und verbreitetsten Insektenfamilien dar. Sie ist in Europa mit einem Anteil von etwa 25% an der limnischen Insektenfauna vertreten (13, 22, 50, 51, 54). Die Chironomiden sind im deutschen Sprachraum unter der Bezeichnung "Zuckmücken" bekannt; dieser Name geht auf die eigenartigen "zuckenden" Bewegungen, die einige einheimischen Arten mit ihren gestreckten Vorderbeinen ausführen (45, 59, 60) zurück. Die nicht stechende adulte Mücke (Imago), äußerlich den Stechmücken ähnlich (Abb.2) lebt nur wenige Tage. Während der Paarungszeit kann ihre Zahl so stark ansteigen, daß sie zu einem gesundheitlichen Risiko für den Menschen wird (20, 32, 33, 34, 40, 52). Die 5-17mm langen Larven (Abb.1), welche ein beliebtes Futter für (Zier-) Fische darstellen, besitzen in ihrer Hämolymphe eine hohe Konzentration (90% der Proteine) nicht zellgebundener, rot gefärbter

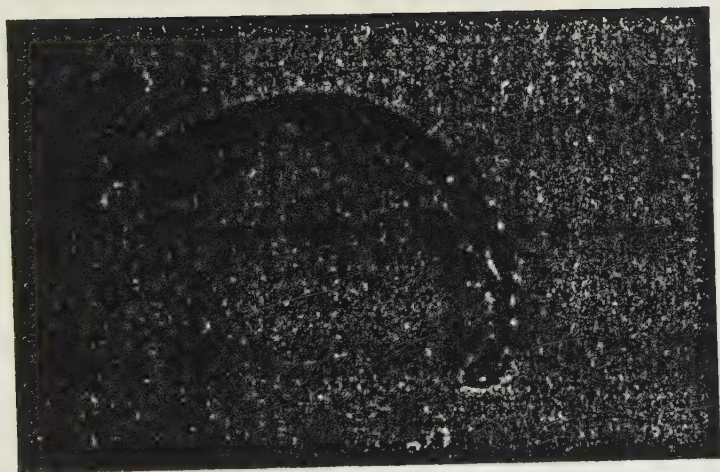


Abb. 1
Ausgewachsene Larve der Art *C. thummi*; Länge ca. 13mm.



Abb. 2
Männliches adultes Insekt der Art *C. thummi*; Länge ca. 14mm.

Hämoglobine. Die Entwicklung zum adulten Insekt schließt 4 Larvenstadien, die sich je nach Art über jeweils 1-3 Wochen erstrecken und das anschließende, ca. 3 Tage umfassende Puppenstadium ein. Im Verlaufe der Verpuppung wird das Hämoglobin, das die in sauerstoffarmen Biotopen lebenden Arten in besonders hoher Konzentration enthalten, sukzessive abgebaut. Die ausschlüpfende Mücke ist im allgemeinen rosafarben und nimmt dann nach wenigen Tagen eine grüne oder graue Farbe an.

2. Patientengut, Material und Methoden

2.1. Kollektiv der untersuchten Personen

Patientengut: In die Untersuchungen wurden 12 Aquarianer, Beschäftigte in Zoohandlungen oder Fischfutter-Fabriken einbezogen, die gegenüber Chironomiden-Larven exponiert waren. Zusätzlich untersuchten wir die Serumproben von 4 sudanesischen Patienten, welche infolge Kontakt mit Imagines der Chironomiden-Art *Cladotanytarsus lewisi*, Atemwegsallergien insbesondere asthmatische Beschwerden entwickelt hatten; diese Seren wurden uns von Prof. A.B. Kay (Brompton-Hospital, London) zur Verfügung gestellt.

Kontrollkollektiv: Um unspezifische Einflüsse auf die RAST-Bestimmungen ausschließen zu können, testeten wir parallel zur oben genannten Gruppe Seren von 10 gesunden, nicht exponierten Probanden.

2.2. Methodik

2.2.1. Gewinnung und Auftrennung der Allergene

Als Ausgangsmaterial dienten Larven von 13 verschiedenen Chironomiden-Arten, Puppen und Imagines von *C. luridus* und *C. tentans* sowie Imagines von *C. bernensis*, *C. tepperi*, *C. lewisi*, *Einfeldia* Sp.4 und *C. thummi*. Die 14 Chironomiden-Arten, von denen Extrakte untersucht wurden, sind entsprechend ihres Verwandtschaftsgrades in Abb.3 dargestellt.

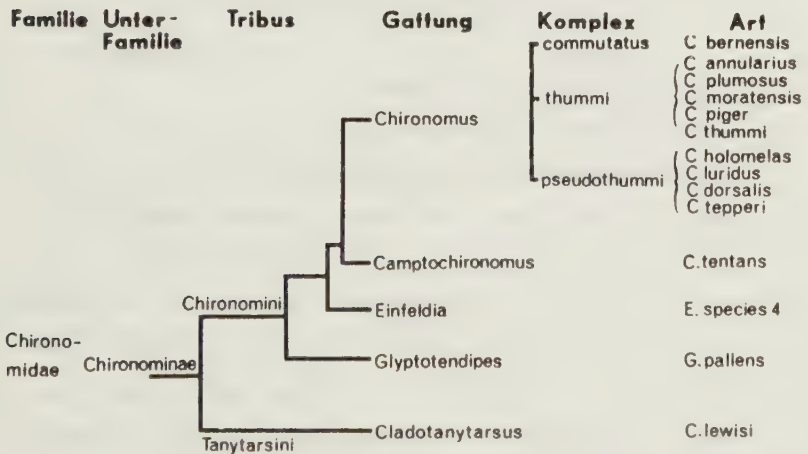


Abb.3

Entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft zwischen den einzelnen untersuchten Chironomiden-Arten nach: Keyl (35) und nachfolgenden Untersuchern (51).

Die Aufarbeitung der Chironomiden erfolgte in Anlehnung an Braun et al. (14). Beispielhaft wird die Extraktion der Allergene aus Larven von *C. thummi* beschrieben. Als Beispiel sei die Aufarbeitung von 100g Larven angegeben: Die tiefgefrorenen Larven wurden in 25mM Kaliumphosphatpuffer, 3% Thiodiglykol (Reduktionsmittel zum Schutze von Methionin), pH 6, homogenisiert. Nach Zentrifugation der Larvensuspension bei 4°C und 10.000 U/min und Dialyse des dunkelroten Überstandes erfolgte das Gefriertrocknen des Dialysates. Dieser Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet. Er diente als Ausgangssubstanz für die Ammoniumsulfat-Fällung (2.2.1.1). In gleicher Weise wurden die Extrakte von Puppen und Imagines hergestellt.

2.2.1.1. Fraktionierung der Larvenrohextrakte

2.2.1.1.1 Ammoniumsulfat-Fällung

Der dunkelrote Rohextrakt von *C.thummi*-Larven setzt sich aus der Hämolymphe und anderen hochmolekularen Bestandteilen zusammen. Das Hämoglobin macht etwa 90% des Proteins der Hämolymphe aus (14, 15, 16, 17). Eine erste Auftrennung des Rohextraktes erreicht man mit Hilfe der fraktionierten Fällung mit Ammoniumsulfat: 22g Ammoniumsulfat pro 100ml Rohextrakt wurden zugefügt. Nachdem sich alles Salz gelöst hatte, zentrifugierten wir bei 4°C und 12.000 U/min 30 Minuten lang. Ein großer Teil der Fremdproteine sowie ein hochmolekularer Glykoproteinanteil sammelte sich im Niederschlag. Er wurde mit PI bezeichnet. Die Fällung der Hämoglobine erreichten wir durch 80%ige Sättigung des Überstandes mit Ammoniumsulfat. Die Mixtur wurde zur vollständigen Ausfällung der Hämoglobine über Nacht bei 4°C mit einem Magnetrührer homogenisiert. Durch Zentrifugation bei 15.000

U/min konnte der Niederschlag abgetrennt werden (Abb.4). Dieser hämoglobinreiche Niederschlag (Hb), der Überstand (Sy) sowie die initiale Ausfällung (PI) wurden anschließend mehrere Tage dialysiert und dann lyophilisiert.

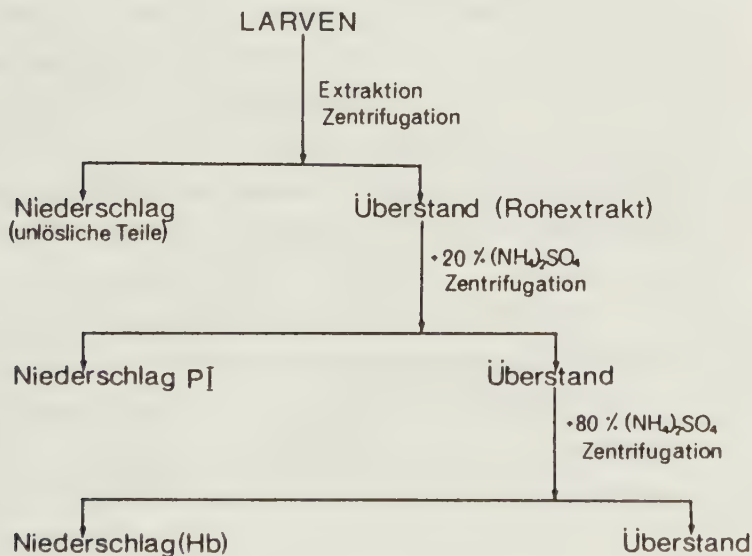


Abb.4

Schematische Darstellung der Larven-Extraktion.

2.2.1.1.2 Gelchromatographie

Die Gelfiltration der Rohextrakte von *C.thummi*-Larven (100mg), *C.tentans*-Larven (100mg) und Imagines (75mg) erfolgte auf einer Sephadex G 75 superfine-Säule (2,4x96cm). Die Rohextrakte wurden in je 3ml 2,5mM Kaliumphosphatpuffer, 0,1% Thiodiglykol, pH 6, gelöst, auf die Säule gegeben und mit demselben Puffer eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 20ml/h. Wir sammelten Fraktionen von

je 4ml. Die Fraktionen der einzelnen Peaks wurden unter Berücksichtigung des Chromatogrammes gepoolt, gegen H_2O dialysiert und schließlich lyophilisiert.

2.2.1.1.3 Diskelektrophoretische Analyse

Die elektrophoretische Auftrennung der Larvenrohextrakte erfolgte nach dem von Davis (21) und Ornstein (42) beschriebenen Verfahren. Die Disk-Elektrophorese ist ein diskontinuierliches Trennsystem, welches als Träger Polyacrylamidgele verwendet. Sie erlaubt eine Trennung in Abhängigkeit von der Ladung der Moleküle. Polyacrylamidgele entstehen durch Polymerisation von Acrylsäureamid mit N'N'-Methylenbisacrylsäure als Vernetzer.

Herstellung der Polyacrylamidgele

Trenngel :

Lösung A: 36,3g TRIS + 48ml 1 N HCl + 0,46ml TEMED + H_2O auf 100ml, pH 8,9.

Lösung B: 25g Acrylsäureamid + 0,4g N'N'-Methylenbisacrylsäureamid + H_2O auf 100ml.

Lösung C: 0,15g Ammoniumperoxodisulfat + H_2O auf 50ml.

Sammelgel :

Lösung a: 15g Acrylsäureamid + 0,4g N'N'-Methylenbisacrylsäureamid in 50ml H_2O .

Lösung b: 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8.

Lösung c: 1,5% Ammoniumperoxodisulfat.

Elektrodenpuffer : 43,25g Glycin + 9g TRIS + H₂O auf 1 l, pH 8,3;

wird unmittelbar vor Gebrauch 1:10 mit H₂O verdünnt.

Wir verwendeten ein 10%iges Trenngel, das aus 6ml Lösung A + 19,2ml Lösung B + 5ml Lösung C + 16,8ml H₂O hergestellt wurde.

Das Sammelgel besteht aus 2,5ml Lösung a + 5ml Lösung b + 11,5ml H₂O + 1ml Lösung c + 20µl TEMED.

Als Apparatur diente eine Elektrophorese-Zelle der Fa. Bio-Rad. 30ml des entgasten, noch flüssigen Trenngels wurden in einer sandwichartigen Vorrichtung, bestehend aus 2 Glasplatten, Spacer und Halter gebracht. Nach Polymerisation überschichtet man das Trenngel mit 7ml der entgasten Sammelgel-Lösung. Die Aussparungen für die Auftragebehälter erhält man mit Hilfe eines Teflonkammes, der als Gußform eingesetzt wurde. Nach Polymerisation des Sammelgels und Entfernung des Kammes wurden ca. 40µl Proben mit Konzentrationen von 2,5-10mg/ml aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 50mA über 2-2,5 Stunden. Es schloß sich die Fixierung und Färbung mit Amidoschwarz 10 B in 7% Essigsäure an.

2.2.2. Methoden der Allergiediagnostik

2.2.2.1. RAST

Der Radio-Allergo-Sorbens-Test, RAST, dient zum Nachweis von spezifischen, gegen bestimmte Allergene gerichteten IgE-Ak im Serum.

Prinzip : Das Patientenserum wird mit den an eine feste Phase, z.B. Cellulose oder Sephadexpartikel, kovalent gekoppelten Antigenen,

inkubiert (8, 9, 18). Zu den dann gewaschenen Scheiben gibt man radioaktiv markiertes Anti-IgE. Die nach erneutem Waschen verbliebene Radioaktivität ist der Serumkonzentration der gegen die getesteten Allergene gerichteten IgE-Ak proportional (Abb.5).

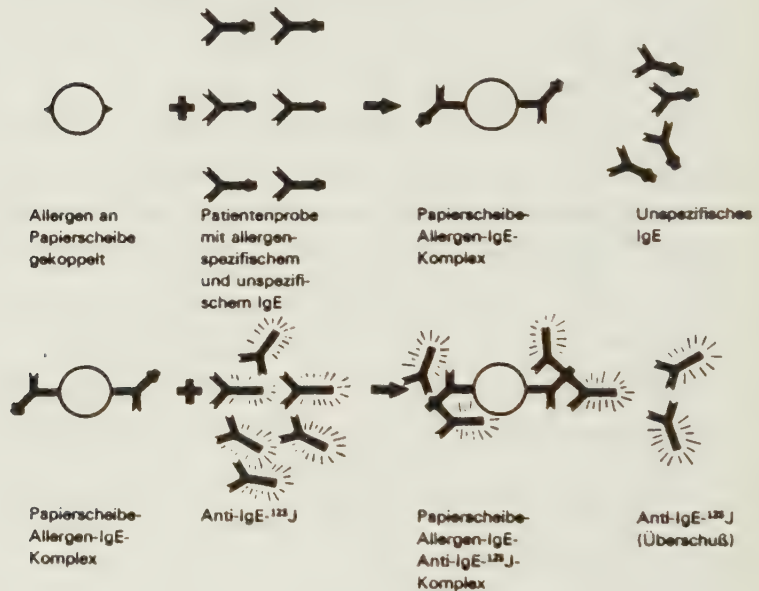


Abb. 5
Prinzip des RAST.

Verwendet werden die von uns an Cellulosescheiben gekoppelten Extrakte und isolierte Antigenfraktionen. RAST-Werte höher als 0,35 U/ml werden als positiv eingestuft.

2.2.2.2. RAST-Inhibition

Dem RAST-Inhibitionstest liegt das Prinzip der gegenseitigen

Inhibition der Antigen-Antikörper-Reaktion durch gleichartige oder immunologisch verwandte Allergene zugrunde. Die prozentuale Inhibition der Ak-Bindung wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{a-b}{a} \cdot 100$$

- a: Wert der normalen RAST-Bestimmung (Zusatz von 0,1 M Phosphat-Puffer)
 b: Wert des Inhibition-RAST (Vorinkubation der Serumprobe mit einer bestimmten Antigenlösung)

Mit Hilfe dieses Tests lassen sich qualitative Messungen zur Frage der Allergenverwandtschaft wie auch quantitative Messungen der Allergen-Konzentration z.B. im Rahmen der Standardisierung von Extrakt-Lösungen durchführen. Die erhaltenen Inhibitionswerte werden in einem Diagramm in Abhängigkeit von der eingesetzten Inhibitor-Menge aufgetragen.

2.2.2.3. Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony (43)

Prinzip: Antigen und Antikörper-Lösungen diffundieren in einem Trägermedium (Agar-Agar oder Agarose) aufeinander zu. In dem Bereich, in dem die Komponenten der beiden Lösungen zusammentreffen, am Äquivalenzpunkt, entstehen Ag-Ak-Komplexe, die als scharf begrenzte Linien sichtbar sind.

Ausführung: Aus einer mit 1% gepufferter Agarose beschichteten Glasplatte (2.2.2.4.3) wurden mittels einer Schablone 20ul Löcher ausgestanzt. Die zentralen Stanzlöcher wurden mit rekonstituiertem Kaninchen-Antiserum (2.2.2.4.2) gefüllt, während die äußeren, zirkulär angeordneten Stanzlöcher die verschiedenen Chironomiden-Extrakte

enthielten. Nach 72 Stunden Inkubation erfolgte das Trocknen und Färben der Platten wie unter 2.2.2.4.3 beschrieben.

2.2.2.4. Immunelektrophoretische Techniken

2.2.2.4.1 Gewinnung von Kaninchen-Antisera gegen Chironomiden-Antigene

Antisera gegen Larvenrohextrakt und gegen die Gesamt-Hämoglobinfraction von *C. thummi* wurden durch wiederholte subkutane Injektionen (10-15mg Antigen gelöst in Freund'schen Adjuvans im Abstand von 2 Wochen) erzeugt. Um das Immunsystem zu aktivieren, verabreichte man in der ersten Impfdosis komplettes Freund'sches Adjuvans, das zusätzlich zu den Komponenten des ansonsten verwendeten inkompletten Freund'schen Adjuvans (Arlacel A und Bayol F) *M.tuberculosis*- oder *M.butyricum*-Zellen enthielt. Nach viermaligem Boostern nahmen wir die Blutabnahme vor.

2.2.2.4.2 Isolierung der Immunglobulinfraction aus Kaninchenserum

Die Isolierung der Immunglobulinfraction erfolgte durch 25% Ammoniumsulfatfällung. Nach Zentrifugation waren ca. 98% der Immunglobuline ausgefallen. Der Überstand, der vorwiegend Transferrin, Alpha-Globuline, Hämoglobin, enthielt, wurde verworfen. Es folgte eine Dialyse des Präzipitats über 24 Stunden. Die Dialyse wurde fortgesetzt gegen 0,5 M Natriumacetat/0,021 M Essigsäure, pH 5, dann nochmal gegen H_2O . Das während der Dialyse entstandene Lipoprotein-Präzipitat, welches für den schwer zu entfärbenden Hintergrund in der später dargestellten Immunelektrophorese verantwortlich ist, eliminiert man durch Zentrifugation. Es folgte eine Rekonstitution auf das

ursprüngliche Serumvolumen durch Zufügen von 0,9% NaCl.

2.2.2.4.3 Vorbereitung der Gelplatten, Waschen, Färben und Entfärben

Als Trägersgele für die von uns durchgeführten immunoelektrophoretischen Techniken wählten wir 1-1,5% Agarosegele in Barbitalspuffer (0,73 M TRIS, 0,024 M Barbitol, 0,003 M NaN_3). Die Agarose-Lösung wird bei ca. 100°C bis zur völligen Transparenz erhitzt; 12-16ml der heißen Agarose-Lösung gießt man anschließend auf gut entfettete Glasplatten (5x7cm, 8,4x9,4cm). Nach Erstarren des Gels werden mittels verschiedener Schablonen Löcher oder Rinnen ausgehoben. Nach beendeter Elektrophorese werden die nicht präzipitierten Proteine mit 0,9% NaCl ausgewaschen. Hierfür legt man die Gelplatten für ca. 24 Stunden in physiologische Kochsalzlösung. Anschließend wird zweimal mit destilliertem Wasser 10 Minuten gewaschen. Nach Pressen und Trocknen der Gelplatten erfolgt die Färbung mit 5% Coomassie Brilliant-Blue R-250 in 45% Ethanol, 10% Essigsäure. Die Entfärbung mit 45% Ethanol, 10% Essigsäure dauert ca. 30 Minuten.

2.2.2.4.4 Immunelektrophorese nach Grabar und Williams (26, 27)

Die Immunelektrophorese nach Grabar und Williams ist eine Kombination der Agarosegel-Elektrophorese mit einer anschließenden Immundiffusion. Damit können Mobilität und Antigenität eines Proteins in 2 aufeinander folgenden Arbeitsgängen untersucht werden. Zunächst wurde das Proteingemisch (monomere und dimere Hämoglobine von *C. thummi*, Konz. 10-20mg/ml) elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Auftrennung erfolgte in Agarosegelen (2.2.2.4.3). Nach der Elektrophorese ließ man das in einer Rinne im Agarosegel befindliche Kaninchen-Antiserum (100-200µl) gegen die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine diffundieren. Nach

ca. 2 Stunden erschienen die ersten zarten Präzipitationen, nach 12-24 Stunden war die Immundiffusion abgeschlossen. Um Kreuzreaktionen verschiedener Komponenten sichtbar zu machen, modifizierten wir die oben beschriebene Methode, indem wir die Antiserumrinnen durch kleine Gelbrücken unterbrachen.

2.2.2.4.5 Gekreuzte Immunelektrophorese (CIE)

Durch Kombinieren der Immunelektrophorese nach Grabar und Williams mit dem Elektroimmunoassay nach Laurell (39) entstand die gekreuzte Immunelektrophorese <Clarke und Freeman (19)>. Hierbei erfolgte zunächst eine Auftrennung des Antigengemisches in einem antikörperfreien Gel (erste Dimension), anschließend eine Elektroimmundiffusion in das angrenzende, antikörperhaltige Gel (zweite Dimension).

Ausführung: Die Antigene - je 15µl (Konz. 15mg/ml) vom Rohextrakt der Art *C. thummi* - wurden in nebeneinander gelegene Stanzlöcher der 84x95mm großen Agaroseplatte appliziert. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 40mA über 50 Minuten (Abb.6a). Danach wurde das Gel mit den getrennten Proteinen in 2cm breite Streifen geschnitten, je ein Streifen auf eine zweite Glasplatte übertragen und ein antikörperhaltiges Gel, das 50µl Antiserum/ml Agarose enthielt, angegossen (Abb.6b). Nach Verfestigung des Gels wurde die Elektroimmundiffusion mit ca. 2 V/cm über 14-16 Stunden durchgeführt, so daß die einzelnen bereits getrennten Komponenten im rechten Winkel zur Trennung in der ersten Dimension in das angrenzende, antikörperhaltige Gel wanderten und raketenförmige Immunpräzipitate in Form von Gauss'schen Verteilungskurven bildeten. Die Fläche der einzelnen Präzipitate ist der Konzentration des

entsprechenden Proteins direkt proportional. Waschen, Trocknen, Färben und Entfärben erfolgte wie in 2.2.2.4.3 beschrieben.

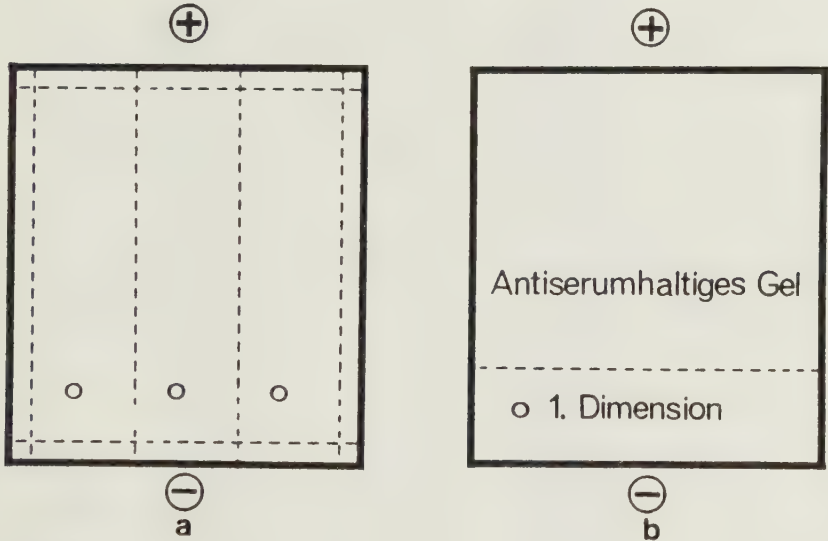


Abb. 6

Schematische Darstellung der gekreuzten Immunelektrophorese auf einer 8,4x9,4cm großen Agarosegelplatte.

Links: erste Dimension;
elektrophoretische Auftrennung der Allergenprobe.

Rechts: zweite Dimension;
Elektrophorese im antikörperhaltigen Gel.

2.2.2.4.6 Gekreuzte Radio-Immunelektrophorese (CRIE)

Die von Weeke und Löwenstein 1973 (41, 65) eingeführte gekreuzte Radio-Immunelektrophorese (CRIE) ist eine Weiterentwicklung der CIE.

Die Methode eignet sich v.a. zur Darstellung spezifischer IgE-Antikörper gegen einzelne Antigen-Bestandteile, welche zuvor mit tierischen Antiseren entsprechend der CIE präzipitiert werden müssen.

Ausführung: Die nativen ungefärbten Präzipitat-Platten der normalen gekreuzten Immunelektrophorese (2.2.2.4.4) wurden nach Pressen und dreimaligem Waschen in 0,9% NaCl nacheinander mit folgenden Lösungen inkubiert:

- a) 150-200 µl Patientenserum in 10ml 0,9% NaCl über Nacht bei Raumtemperatur,
- b) 100 µl ^{125}J -markiertes Antihuman-IgE in 10ml 0,015 M Phosphatpuffer pH 7,5, 0,3% BSA, 0,9% NaCl, 0,1% Na_3N , 0,1% EDTA über 6 Stunden.

Den einzelnen Inkubationsschritten folgten ausführliche Waschvorgänge, dann eine Autoradiographie über 7 Tage auf Kodak RP-Film.

2.2.2.5. Immunoblot (63)

Das "Transblotting" stammt aus der DNS-RNS-Forschung (1, 57). Hierbei werden Proteingemische, die mit elektrophoretischen Methoden in die einzelnen Komponenten aufgetrennt worden sind, unter Zuhilfenahme eines elektrischen Feldes von Trenngel auf eine aktivierte Folie (Nitrocellulose, ABM-Papier, Zeta-Papier etc.) ohne Verlust übertragen. Die auf diese Art erhaltenen Proteinbanden sind nun verschiedensten immunologischen, enzymatischen und anderen analytischen Untersuchungen zugänglich.

Ausführung : Die Auftrennung des Gesamt-Hb von *C. thummi* in die einzelnen Hämoglobinkomponenten erfolgte mittels nicht denaturierender Diskelektrophorese nach Ornstein (42) und Davies (21) (2.2.1.1.3). Unter Verwendung einer Apparatur der Fa. Bio-Rad konnte anschließend die Übertragung der einzelnen Proteinbanden vom Trenngel auf Nitrocellulose-Folien (0,45 µm Porengröße) erfolgen. Den Versuchsaufbau

zeigt Abb.7.

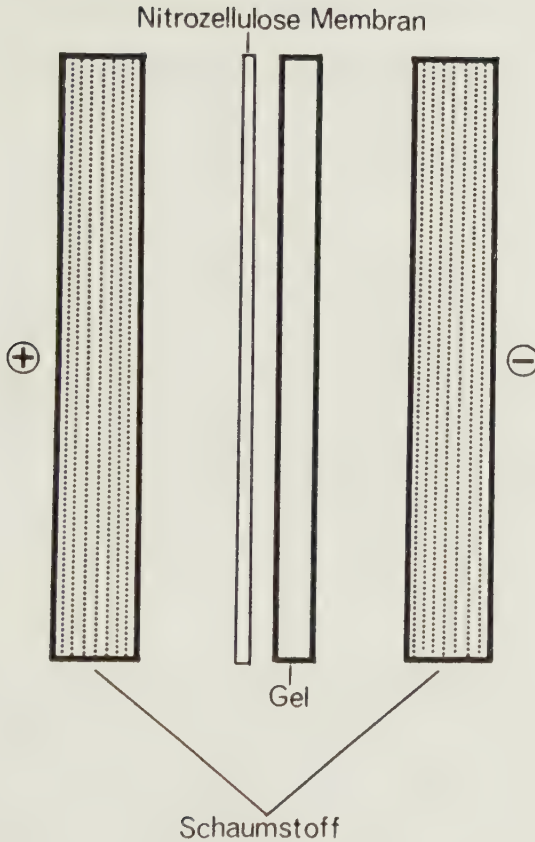


Abb. 7

Schematische Darstellung des elektrophoretischen Proteintransfers vom Trenngel auf Nitrocellulose (0,45µm Porengröße).

Die Nitrocellulose-Folien wurden blasenfrei auf das native Polyacrylamidgel gelegt und mit den Schaumstoffplatten im Transblot-Apparat fixiert. Als Elektroden-Puffer verwendeten wir 25mM TRIS, 192mM Glycin-Puffer/20% (vol/vol) Methanol, pH 8,3. Das "Transblotting" erfolgte über 1,5 Stunden bei 225mA. Sodann konnten die

Nitrocellulose-Folien in 5-6mm breite Streifen geschnitten werden. Die auf den Nitrocellulose-Streifen übertragenen Proteinbanden wurden entweder mit 0,1% Amidoschwarz 10 B gefärbt (Abb.26) oder mit folgenden Lösungen inkubiert:

- a) 3% Gelatine-Hydrolysat in 15mM TRIS-HCl, pH 7,4, eine Stunde bei 38°C.
- b) 100-150µl Patientenserum, verdünnt in 2,5ml 0,9% NaCl, 6 Stunden.
- c) 50-100µl ¹²⁵J-markiertes Anti-IgE in 2,5ml 0,9% NaCl über Nacht.

Den einzelnen Inkubationsschritten folgten ausführliche Waschvorgänge. Anschließend wurden die Nitrocellulose-Streifen getrocknet und eine Autoradiographie über 24 Stunden durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung und Charakterisierung der Chironomiden-Allergene

3.1.1. Rohextrakte von Larven, Puppen und Imagines verschiedener Chironomiden-Arten

3.1.1.1. Orientierende Charakterisierung der Extrakte

Die durch Extraktion in Kaliumphosphat-Puffer erhaltenen Larvenrohextrakte sind dunkelrot bis braun gefärbt und trüb. Die Ammoniumsulfat-Fällungen bei *C.thummi*-Larven ergeben 3 Fraktionen (Abb.4): PI, ein bräunlicher Niederschlag, der ca. 83% Hb enthält; Sy, ein gelblicher Überstand und schließlich die rote Hb-Fraktion. Die Puppen- und Imaginesrohextrakte sind grünlich bis braun gefärbt und enthalten ca. 5% Hb (Puppen) bzw. 1-3% Hb (Imagines).

3.1.1.2. Allergenaktivität der Extrakte von Larven, Puppen und Imagines

Die Allergenaktivitäten der verschiedenen Rohextrakte werden im RAST verglichen, wobei die Seren von 8 sensibilisierten einheimischen Kontaktpersonen zur Anwendung kommen. Unter Berücksichtigung der Assay-Fehlerstreuung zeigen die RAST-Ergebnisse, daß die Larvenrohextrakte der 13 untersuchten Chironomiden-Arten keine wesentlichen Unterschiede in ihrer Antigenaktivität aufweisen (Abb.8). Nur *C. holomelas*, *C. luridus* und *C. dorsalis* erreichen etwas niedrigere Aktivitäten als die anderen Arten.

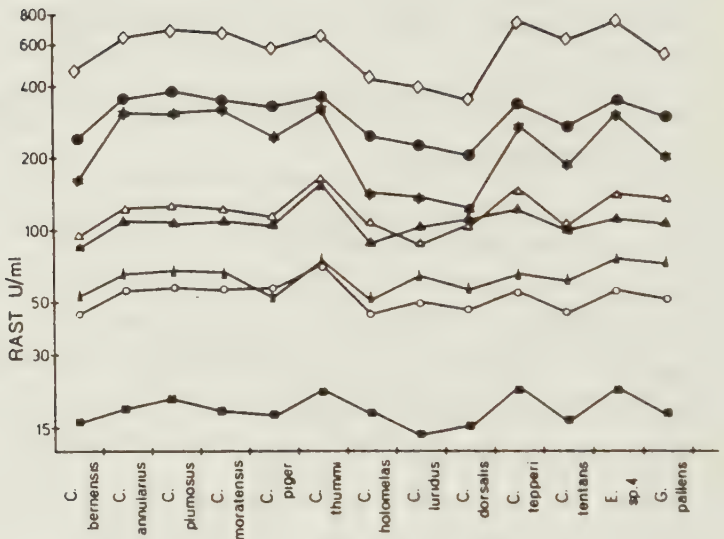


Abb. 8

Allergenaktivität von 13 verschiedenen Larvenrohextrakten. Die einzelnen Symbole stellen die RAST-Werte von 8 klinisch sensibilisierten Personen dar.

Ein ähnliches Reaktionsmuster zeigen die RAST-Werte der Imaginesrohextrakte. Eine Ausnahme stellt die afrikanische Art, *C. lewisi*, infolge niedrigerer Antigenaktivitäten dar (Abb.9). Der Rohextrakt von *C. luridus*-Puppen (Imagines standen hier nicht zur Verfügung) besitzt vergleichbare Werte wie die Imaginesrohextrakte. Stellt man die RAST-Ergebnisse der einzelnen Entwicklungsstadien einander gegenüber, fällt auf, daß die Larvenrohextrakte ca. zweimal höhere Antigenaktivitäten besitzen.

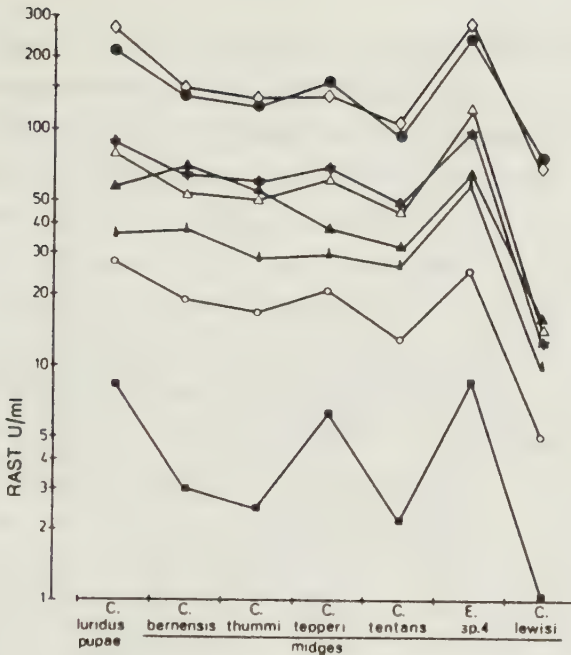


Abb. 9

Allergenaktivität von 6 verschiedenen Imagines- und einem Puppenrohextrakt. Die einzelnen Symbole stellen die RAST-Werte von 8 klinisch sensibilisierten Personen dar.

In Vorversuchen mit Seren unseres Kontrollkollektivs ist eine unspezifische IgE-Bindung ausgeschlossen worden.

• 3.1.1.3. Immunologische Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Chironomiden-Arten

3.1.1.3.1 Menschliche Seren gegen C.thummi-Larven

Die Ergebnisse aus 3.1.1.2. zeigen, daß Bestandteile aller untersuchten Chironomiden-Arten mit Antikörpern sensibilisierter

Personen reagieren. Dies legt die Annahme einer immunologischen Kreuzreaktion zwischen den verschiedenen Spezies nahe. Um die Frage der Antigenverwandtschaft zuverlässig beantworten zu können, bedienen wir uns des RAST-Inhibitionstestes (2.2.2.2.). Als Testserum wählen wir das Serum eines Insektenforschers, der ausschließlich gegen *C.thummi*-Larven sensibilisiert ist. Die Vorinkubation erfolgt mit 8 Larvenrohextrakten, 6 Imaginesrohextrakten und einem Puppenrohextrakt. Der anschließend durchgeführte RAST mit an Scheiben gekoppeltem *C.thummi*-Hb zeigt in allen Fällen eine dosisabhängige Inhibition der IgE-Antikörper-Bindung. Die Reaktion mit *C. thummi* (homologe Inhibition) wird annähernd zu 100%, jene mit den anderen Arten (heterologe Inhibition) zu 60-80% gehemmt. Mit max. 60% weist die entwicklungsgeschichtlich am weitesten entfernte Spezies *Glyptotendipes pallens* die geringste Hemmwirkung auf (Abb.10).

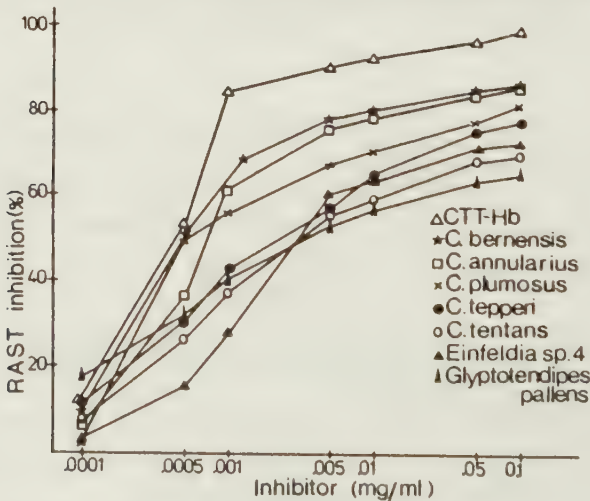


Abb. 10

RAST-Inhibition: Inhibition der IgE-Antikörper-Bindung an *C.thummi*-Gesamt-Hb (RAST-Scheibe) durch Larvenrohextrakt der angegebenen Chironomiden-Arten.

Von Bedeutung ist die Tatsache, daß die Imaginesrohextrakte sowie das *C. luridus*-Puppenrohextrakt die IgE-Ak-Bindung mit *C. thummi*-Gesamt-Hb, ähnlich wie die Larvenrohextrakte, inhibieren. Die max. Inhibitionsrate reicht hier von ca. 90% für *C. thummi*-Imagines und *C. luridus*-Puppen bis ca. 20% für *C. lewisi* (Abb.11).

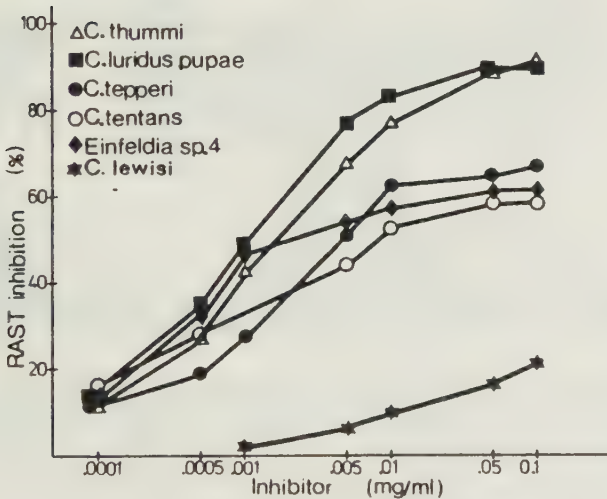


Abb. 11

RAST-Inhibition: Inhibition der IgE-Ak-Bindung an *C. thummi*-Gesamt-Hb (RAST-Scheibe) durch Imagines- bzw. Puppenrohextrakt der angegebenen Chironomiden-Arten.

3.1.1.3.2 Tierische Antiseren gegen Larvenrohextrakt und Gesamt-

Hämoglobin von *C. thummi*

Die immunologische Kreuzreaktion zwischen verschiedenen Chironomiden-Arten kann auch in der Doppelimmundiffusion unter Verwendung von Kaninchen-Antiserum gegen Larvenrohextrakt und

Gesamt-Hb von *C. thummi* dargestellt werden. Das Antiserum gegen *C. thummi*-Gesamt-Hb liefert 2-4 Präzipitationslinien mit allen untersuchten Arten (je eine Art eines jeden Komplexes und einer jeden Gattung wird getestet). Darüber hinaus sind Kreuzreaktionen zwischen den 3 Arten der Gattung *Chironomus* (*C. thummi*, *C. annularius*, *C. piger*) erkennbar (Abb. 12a).

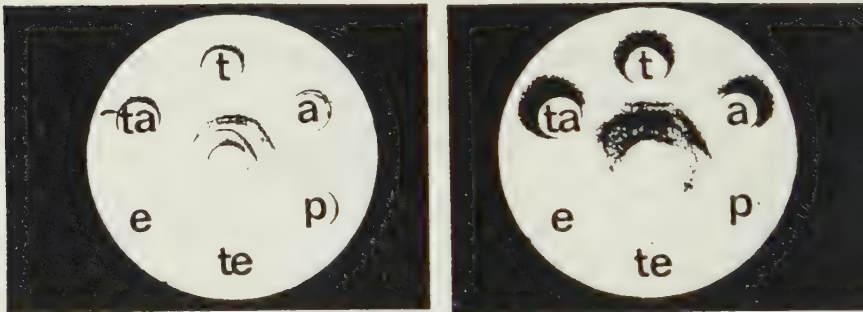


Abb. 12a+b

Doppelimmundiffusion mit Larvenrohextrakten verschiedener Chironomiden-Arten und Kaninchen-Antiserum (zentrale Stanzlöcher) gegen *C. thummi*-Gesamt-Hb (a) bzw. *C. thummi*-Larvenrohextrakt (b).

t = *C. thummi*, a = *C. annularius*, p = *C. piger*, te = *C. tepperi*, e = *Einfeldia* sp.4, ta = *C. tentans*.

Ein weitgehend identisches Reaktionsmuster erhalten wir, wenn, anstatt Antiserum gegen *C. thummi*-Gesamt-Hb Antiserum gegen *C. thummi*-Larvenrohextrakt eingesetzt wird (Abb. 12b). Der einzige abweichende Befund besteht in einer bei einigen Arten zusätzlich auftretenden peripheren Präzipitationslinie. Wie Abb. 12 zeigt, lassen sich 2, bei allen Chironomiden-Arten nachweisbare Präzipitationslinien als homo-dimere Hämoglobine identifizieren, eine andere Linie als monomere Hämoglobine. Von Interesse erscheint die nur partielle Kreuzreaktion zwischen monomerem und dimerem Hämoglobin, die in der

Doppelimmundiffusion (Abb.13) und in der modifizierten Technik nach Grabar und Williams (Abb.14) erkennbar ist.

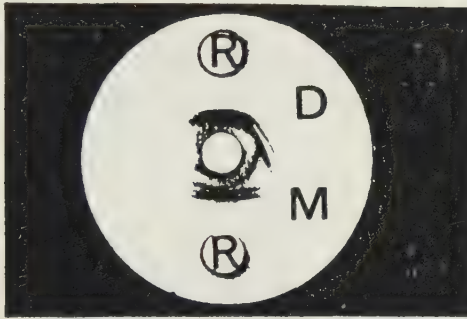


Abb. 13

Doppelimmundiffusion mit C.thummi-Larvenrohextrakt (R), dimerer (D) und monomerer (M) Hämoglobinfraction von C. thummi. Im zentralen Stanzloch wurde Kaninchen-Antiserum gegen C.thummi-Larvenrohextrakt aufgetragen. Man erkennt eine partielle (Spornbildung der zentralen Präzipitationslinien) und komplette Kreuzreaktionen (fließender Übergang der mittleren bzw. äußeren Präzipitationslinie) zwischen der monomeren und dimeren Hämoglobinfraction.

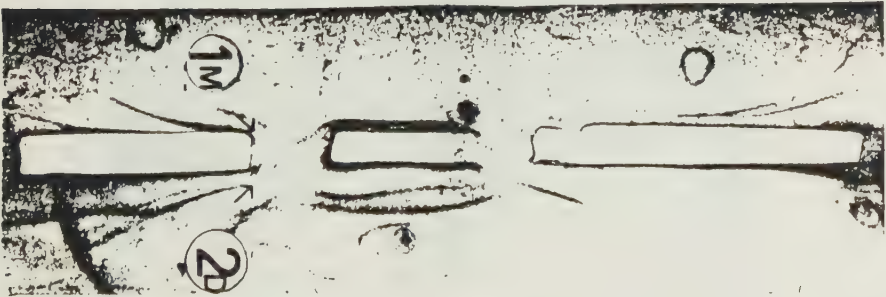


Abb.14

Modifizierte Immunelektrophorese nach Grabar und Williams. Die mittleren Rinnen enthalten Kaninchen-Antiserum gegen C.thummi-Gesamt-Hb, die Auftragslöcher links bzw. rechts monomere (17) respektive dimere (20) Hämoglobine von C.thummi-Larven. Es stellt sich eine immunologische Antigenidentität zwischen Komponenten der monomeren und dimeren Hämoglobinfraction dar, erkenntlich an der kontinuierlichen, bogenförmig zwischen den Serumrinnen verlaufenden Präzipitationslinie (s. Pfeile).

3.1.2. Diskelektrophorese der Chironomiden-Arten verschiedener
Larvenrohextrakte

Abb.15 zeigt die mittels Diskelektrophorese erhaltenen Proteinbanden von Larvenrohextrakten der 13 immunologisch untersuchten Chironomiden-Arten.

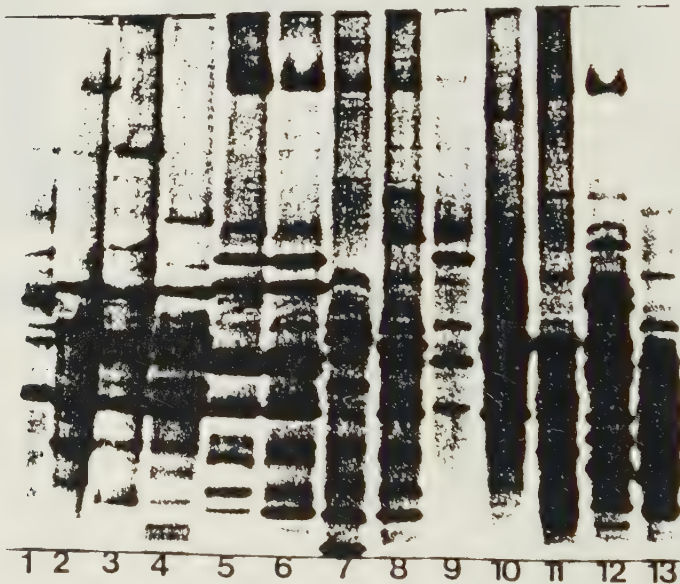


Abb. 15

Diskelektrophorese von Larvenrohextrakten der 13 verschiedenen Chironomiden-Arten:

- | | |
|-------------------------|-----------------------------------|
| 1) <i>C. bernensis</i> | 8) <i>C. luridus</i> |
| 2) <i>C. annularius</i> | 9) <i>D. dorsalis</i> |
| 3) <i>C. plumosus</i> | 10) <i>C. tepperi</i> |
| 4) <i>C. moratensis</i> | 11) <i>C. tentans</i> |
| 5) <i>C. piger</i> | 12) <i>Einfeldia</i> sp.4 |
| 6) <i>C. thummi</i> | 13) <i>Glyptotendipes pallens</i> |
| 7) <i>C. holomelae</i> | |

Während keine sicheren Unterschiede zwischen *C. thummi* und *C. piger* erkennbar sind (geringe phylogenetische Distanz) zeigen sich zwischen allen anderen Arten mehr oder weniger deutliche Variationen sowohl hinsichtlich der Anzahl als auch der Intensität und der Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Banden, welche überwiegend den einzelnen Hb-Komponenten entsprechen (8). Bemerkenswert ist die außerordentliche Vielfalt an Hämoglobinen der einzelnen Arten. So besitzt nahezu jede Chironomiden-Art ihr eigenes Hämoglobinmuster anhand dessen sie ohne Schwierigkeiten identifiziert werden kann.

3.1.3. Verhalten der Antigenaktivität der Chironomiden-Extrakte während der Metamorphose am Beispiel von *C. tentans*

3.1.3.1. Fraktionierung der Larven- und Imaginesrohextrakte von *C. tentans* auf Sephadex G 75 superfine

Die Auftrennung von Larvenrohextrakt von *C. tentans* auf der Sephadex G 75-Säule (2,4x9cm) ergibt 4 Peaks (Abb.16A). Gipfel a enthält großmolekulare Bestandteile, v.a. Glykoproteine (62); die blutrot gefärbten Peaks b und c stellen dimere bzw. monomere Hämoglobine dar, sie sind bereits mit bloßem Auge auf der Säule erkennbar (s. auch Abb.18); Peak d beinhaltet die kleinemolekularen Komponenten. Ein praktisch identisches chromatographisches Bild liefert das Larvenrohextrakt der Art *C. thummi* (Abb.17). Im Vergleich hierzu zeigt das von den Imagines erhaltene Chromatogramm nur 3 Peaks: a', b', c' (Abb.16B). Peak b' besteht aus einer grünlich-braunen Substanz.

3.1.3.2. Allergenaktivität der einzelnen Fraktionen

Die erhaltenen Fraktionen werden gesammelt und ebenso wie der in nur

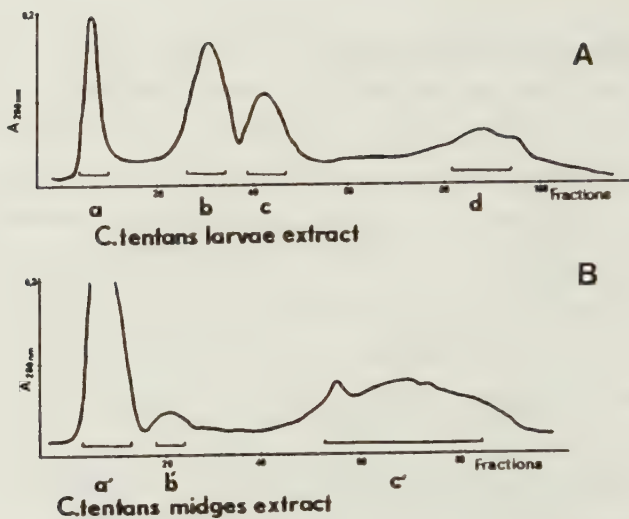


Abb. 16A+B

Sephadex G 75-Gelfiltration der Rohextrakte von Larven A) und Imagines B) von *Camptochironomus tentans* (Säule 2,4x96cm).

C. thummi

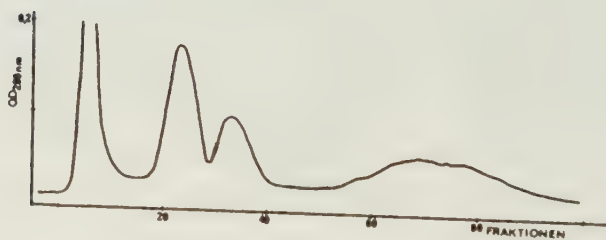


Abb. 17

Sephadex G 75-Gelfiltration des Larvenrohextraktes von *C. thummi* (Säule 2,4x96cm).



Abb. 18
 Sephadex G 75-Chromatographie des Larvenrohextraktes von *C. thummi*.
 Bereits mit bloßem Auge sind die beiden rotgefärbten
 Hämoglobinfractionen erkennbar (untere Bande = Dimere, obere Bande =
 Monomere).

geringem Umfang zur Verfügung stehende Puppenrohextrakt von C. tentans, an Bromcyan-aktivierte RAST-Scheiben gekoppelt. Anschließend RAST-Bestimmungen unter Verwendung von 10 Patientenseren (von 6 deutschen Fischhaltern und 4 sudanesischen Patienten) ergeben eine hohe Allergenaktivität der aus Larven isolierten 2 Hämoglobinfractionen b und c, des Puppenrohextraktes sowie der verhältnismäßig kleinen mittleren Fraktionen b' von Imagines. Die anderen säulenchromatographisch erhaltenen Fraktionen weisen keine oder nur eine geringe Reaktion mit menschlichen IgE-Antikörpern auf (Abb.19 und 20). Der Vergleich der RAST-Werte der 3 Entwicklungsarten dieser Insektenart ergibt eine kontinuierliche Abnahme der Allergenaktivität während der Metamorphose, ähnlich dem Gehalt an Hämoglobin.

3.1.3.3. Immunologische Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien

Der Verdacht, daß die 3 Entwicklungsstadien gemeinsame Antigenkomponenten enthalten, läßt sich durch die gegenseitige Hemmung der Antikörper-Bindung im RAST-Inhibitionstest beweisen (Abb.21). Wir inkubierten das Serum eines sensibilisierten Patienten mit der Fraktion b' der Imagines. Im anschließend durchgeführten RAST fand sich eine dosisabhängige Inhibition der IgE-Antikörper-Bindung nicht nur an die zur Vorinkubation verwendete Fraktion b', sondern auch an den Puppenrohextrakt und an die 2 Hämoglobinfractionen b und c der Larven. Das heißt, daß diese Fraktionen äquivalente Antigen-Determinanten besitzen, die mit derselben Antikörperpopulation reagieren.

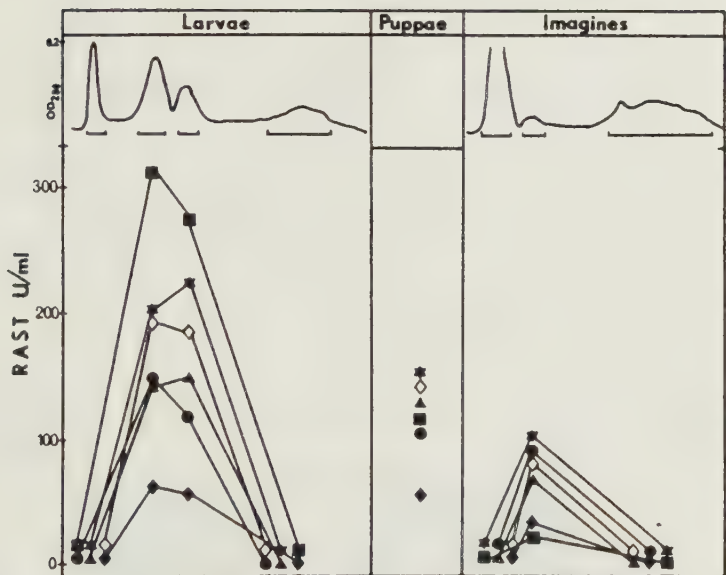


Abb. 19

Verhalten der Antigenaktivität der verschiedenen Sephadex G 75-Fractionen von Larven und Imagines sowie des Puppenrohextrakts von *C. tentans*. Der obere Teil gibt die Chromatogramme wieder, im unteren Teil sind die RAST-Werte der 6 sensibilisierten einheimischen Fischhalter dargestellt.

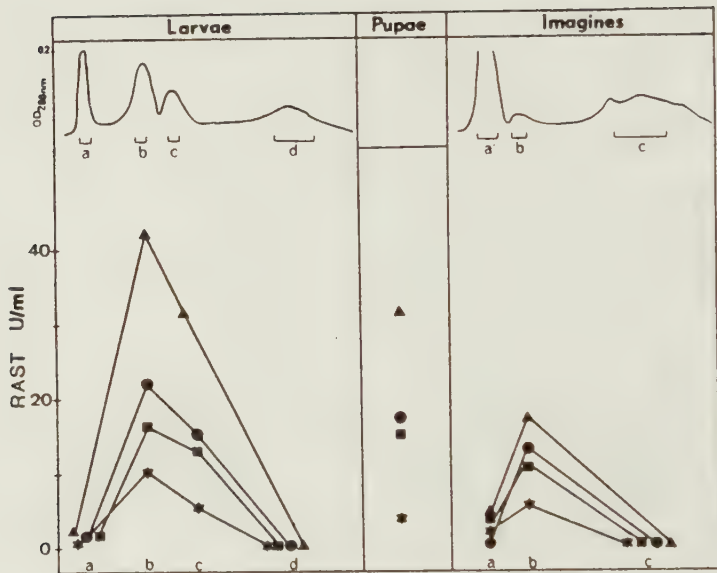


Abb. 20

Verhalten der Antigenaktivität der verschiedenen Sephadex G 75-Fractionen von Larven und Imagines sowie des Puppenrohextrakts von *C. tentans*. Der obere Teil gibt die Chromatogramme wieder, im unteren Teil sind die RAST-Werte der 4 sudanesischen Patienten dargestellt.

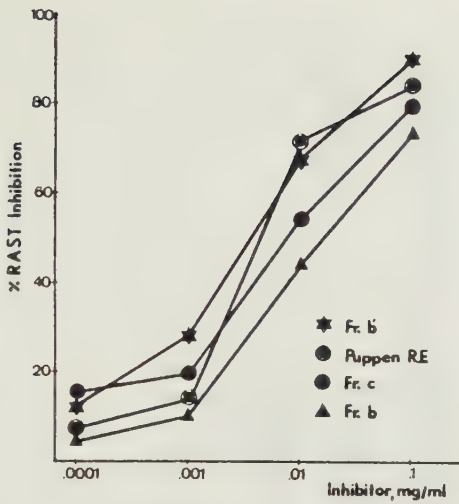


Abb. 21

Inhibition der IgE-Ak-Bindung an die Fraktionen b, c (Larven) und b' (Imagines) sowie an Puppenrohextrakt von *C. tentans* durch Fraktion b' (Imagines).

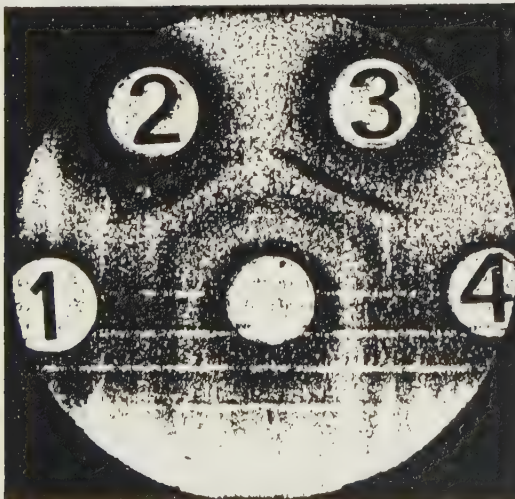


Abb. 22

Doppelimmundiffusion mit Larven (Loch 1 und 4), Puppen (Loch 2) und Imagines (Loch 3) von *C. tentans*, im zentralen Stanzloch Kaninchen-Antiserum gegen *C. thummi*-Gesamt-Hb.

Einen weiteren Beweis der immunologischen Kreuzreaktion zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien von *C. tentans* sowie zwischen verschiedenen Chironomiden-Arten liefert die Doppelimmundiffusion (Abb.22). Kaninchen-Antiserum gegen *C.thummi*-Gesamt-Hb (mittleres Loch) bildet 2 bis 4 Präzipitationslinien mit Larven- (Loch 1 und 4), Puppen- (Loch 2) und Imaginesextrakt (Loch 3); dabei sind Kreuzreaktionen von partieller und vollständiger Identität festzustellen.

Die Diskelektrophorese (3.1.2.) der 13 verschiedenen Larvenrohextrakte zeigte schon, daß die einzelnen Banden überwiegend den einzelnen Hb-Komponenten entsprechen. Das Diskelektrophorogramm der Entwicklungsstadien des *C. tentans* (Abb.23) demonstriert ein ähnliches Muster der Proteinbanden für den Larven- und Puppenrohextrakt, was einer Konservierung der meisten Hämoglobine in der Puppe entsprechen dürfte. Beim Imaginesextrakt fehlt hingegen die Mehrzahl dieser Banden.



Abb. 23

Diskelektrophorese der Rohextrakte von:

- a) *C. thummi*-Larven
- b) *C. tentans*-Larven
- c) *C. tentans*-Puppen und
- d) *C. tentans*-Imagines

3.2. Darstellung des individuellen Antikörpermusters mittels Allergoprint-Techniken

3.2.1. Gekreuzte Immunelektrophorese und gekreuzte Radio-Immunelektrophorese (9, 10, 11, 12, 46, 47)

Die gekreuzte Immunelektrophorese liefert qualitative und quantitative Daten über die Antigenkomponenten eines Antigenkomplexes. Abb.24 zeigt das Immunogramm von C.thummi-Gesamt-Hb, welches mit Hilfe von Kaninchen-Antiserum gegen C.thummi-Gesamt-Hb erhalten wird. 11 bis 12 Präzipitationslinien, entsprechend einzelnen Hämoglobin-Komponenten sind sichtbar.

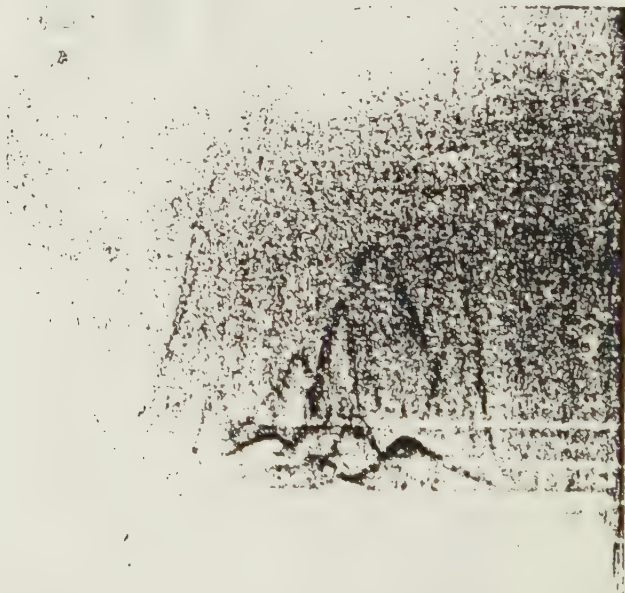
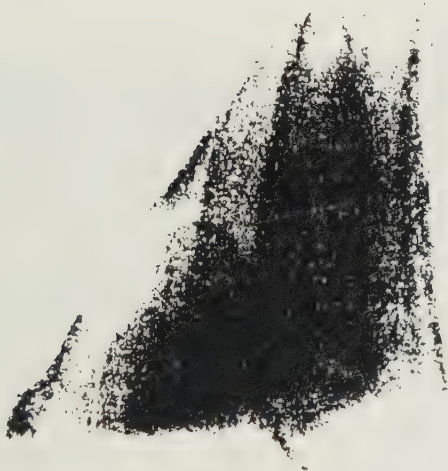


Abb. 24
Gekreuzte Immunelektrophorese von C.thummi-Gesamt-Hb mit Kaninchen-Antiserum gegen C.thummi-Gesamt-Hb (Platte 8,4x9,4cm).

In Abb.25 ist das nach Inkubation der nativen Platten der gekreuzten

Immunelektrophorese mit Patientenserum und ^{125}J -Antihuman-IgE erhaltene Autoradiogramm dargestellt. Man erkennt, daß alle Präzipitate aus Abb.24 die IgE-Antikörper des Serumpools binden.



⌋

Abb. 25

- Gekreuzte Radio-Immunelektrophorese mit Hämoglobinfraktion von *C. thummi* und einem Poolserum von 2 sensibilisierten Patienten (Platte 8,4x9,4cm).

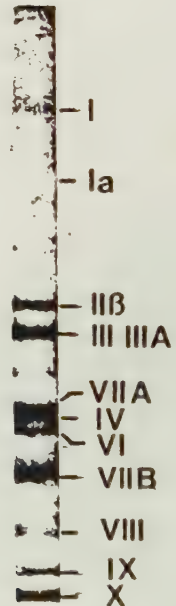
3.2.2. Immunoblot (8, 9, 12, 47)

Nach diskelektrophoretischer Trennung der Hämoglobin-Fraktion von *C. thummi* (3.1.2.), anschließendem Transblotting und Färben der Proteine

erhält man 11 bis 12 Banden, die - wie bereits frühere Untersuchungen gezeigt haben (14) -, monomeren und homo-dimeren Hämoglobinen entsprechen (Abb.26). Durch aufeinander folgende Inkubationen gleichartiger, jedoch ungefärbter Nitrocellulose-Streifen mit Patientenserum und ^{125}J -Anti-IgE mit darauffolgender Autoradiographie entstehen die in Abb.27 wiedergegebenen Immunogramme.

Abb. 26

Transblotting auf Nitrocellulose der in der Disk-elektrophorese aufgetrennten Hämoglobinfraction von C.thummi-Larven. Die nach Proteinfärbung erkennbaren Banden I-X stellen einzelne, in ihrer Primärstruktur aufgeklärte Hämoglobin-Komponenten dar (14).



Unschwer erkennt man ein mit der Proteinfärbung weitgehend identisches Reaktionsmuster bei Verwendung der meisten Patientenseren. Einzelne Seren weisen jedoch zusätzliche Banden auf (z.B. Patient 10), während

die IgE-Ak anderer sensibilisierter Patienten nicht mit allen Hämoglobinbanden reagieren. So binden sich die Antikörper der Seren Nr. 2, 3, 5 und 8 verhältnismäßig schwach an das Hb CTT I, die Antikörper der Seren Nr. 2, 3 und 11 nur minimal oder nicht an das Hb X. Diese differierenden Muster sind offensichtlich Ausdruck der individuellen immunologischen Reaktionsbereitschaft. Es fällt auch auf, daß die Intensität der Reaktion mit den im RAST nachgewiesenen IgE-Titern gegen *C. thummi* korreliert ist (4, 6, 7, 8).

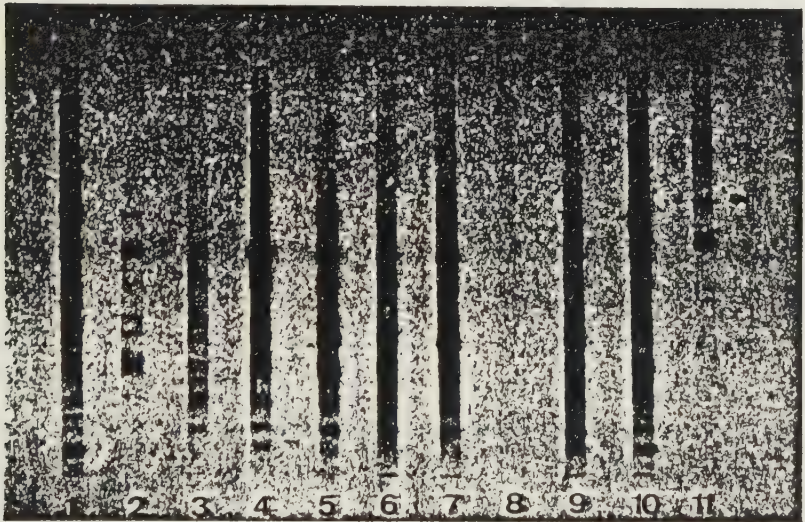


Abb. 27

Allergoprint mittels Transblot-Technik; die Seren der Patienten Nr. 1-11 wurden mit identischen Nitrocellulose-Streifen (elektrophoretisch aufgetrennte Hämoglobinbanden, s. Abb. 26) getestet.

4. Diskussion

4.1. Zur Methodik

4.1.1. RAST und RAST-Inhibitionstest

RAST und RAST-Inhibitionstests wurden mit selbst hergestellten Allergenscheiben durchgeführt. Dazu war es nötig, Cellulosescheiben (Filterpapier Munktell 00) mit Bromcyan zu aktivieren (6, 8, 18) und anschließend die gewünschten Proteine an die aktivierten Scheiben zu koppeln. Hierbei ist es erforderlich, zunächst günstige Bedingungen für die Kopplung (z.B. optimale Ag-Konzentration, pH) herauszufinden. Um eine optimale Beschichtung der Scheiben zu gewährleisten, wurde in Vorversuchen der Einfluß von Kopplungskonzentration und Kopplungs-pH überprüft. Hierbei erwies sich eine Konzentration von $1 \mu\text{g}$ Protein pro 5 ml Pufferlösung ($0,1 \text{ M NaHCO}_3$), pH 8,2, als günstig. In einer Pilot-Studie hatten wir darüber hinaus die Streubreite der mit unseren Allergenscheiben erzielten RAST-Ergebnisse untersucht. Sie lag stets unter 15%. Alle Untersuchungen wurden in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.1.2. Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony

Form und Schärfe der einzelnen Präzipitationslinien sind von der Menge des Antigens und der Antikörper im Antiserum abhängig. Antigenüberschuß kann zu einer Auflösung der Präzipitationslinien führen bzw. die Präzipitation näher zum Antiserumreservoir verlagern. Überschuß an Antikörpern führt zum umgekehrten Phänomen, wenn

Antiserum vom Pferd eingesetzt wird. Überschuß an Kaninchenantiserum bewirkt dagegen eine Verdickung des Präzipitats und einen Verlust an Schärfe (43). In unseren Vorversuchen mit verschiedenen Verdünnungsreihen erwies sich die Konzentration von 10mg Antigen/ml als günstig. Die Zahl der Präzipitationslinien, die mit einem polyvalenten Antiserum erhalten werden kann, korreliert nicht mit der realen Zahl der existierenden Antigen-Antikörper-Systeme. So erkennt man in der Doppelimmundiffusion mit Gesamthämoglobin von *C. thummi* nur 3 Präzipitationslinien (eine für die monomeren, 2 für die dimeren Hämoglobine). Tatsächlich existieren jedoch 11 Antigene entsprechend der Zahl der Einzelhämoglobine.

4.1.3. Immunelektrophorese nach Grabar

Die Immunelektrophorese nach Grabar liefert qualitative und semiquantitative Daten über die Zahl der Antigene in einem Proteingemisch. Nach der elektrophoretischen Wanderung werden die aufgetrennten Proteine der Einwirkung eines präzipitierenden Antiserums ausgesetzt. Die Präzipitation findet nur am Äquivalenzpunkt statt. Der entscheidende Punkt für eine gute Entwicklung der Präzipitationslinien ist auch hier ein optimales Verhältnis zwischen der Konzentration des Antigens und dem Titer des Antikörpers. Um die günstige Konzentration des Antigens zu ermitteln, mußten wir eine Verdünnungsreihe ansetzen. In Vorversuchen stellt sich die Konzentration von 25mg/ml der monomeren bzw. dimeren Hämoglobine bei Einsatz von 150µl Antiserum als Optimum heraus. Der Überschuß an Antigen durchbricht die gebildete Linie allmählich, löst sie auf und führt näher an der Antiserumrinne zur erneuten Präzipitation. Dabei

kann der zentrale Teil des Präzipitationsbogens in diese hineingeschoben werden und damit verschwinden. Da die Auflösung nie ganz vollständig ist, entsteht ein Antigenschleier, eine Fahnenbildung. Eine Verdünnung der Antigenlösung erwies sich als angebracht, während die Verdünnung des Antiserums nicht selten zum Verlust einzelner Präzipitationslinien geführt hat.

4.1.4. Vergleich zwischen gekreuzter Radio-Immunelektrophorese und Immunoblot

Die 2 Allergoprint-Techniken, gekreuzte Radio-Immunelektrophorese und Immunoblot, eignen sich für die Diagnostik von Typ-I-Sensibilisierungen. Man kann hiermit die IgE-Ak-Antwort gegen einzelne Antigene in einem Antigenextrakt erfassen, ferner Major- (bei ca. 90% der Sensibilisierten nachweisbar) und Minor-Ag (bei Ca. 10% der Sensibilisierten nachweisbar) im Rahmen von Screening-Untersuchungen identifizieren. Bei der gekreuzten Radio-Immunelektrophorese erfolgt die Bindung menschlicher IgE-Ak erst nach vorausgegangener Präzipitation der Antigene durch tierisches Hyperimmunserum. Diese Technik eignet sich darüber hinaus zum Nachweis immunologischer Kreuzreaktionen der einzelnen Antigen-Bestandteile eines Proteingemisches.

Demgegenüber besitzt der Immunoblot folgende Vorteile:

- a) Er erlaubt eine einfache, schnell durchzuführende, exakt reproduzierbare und qualitativ gute Auftrennung in die Einzelkomponenten.
- b) Je nach Ausgangssubstanz und klinischer Fragestellung kann die elektrophoretische Auftrennung modifiziert werden (z.B. Einsatz von

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Elektro-Fokussierung).

- c) Die in einem Elektrophoresegang erhaltenen Banden können nacheinander für verschiedene Untersuchungen herangezogen werden, z.B. Reaktion mit IgE-, IgG-Antikörpern, Concanavalin A, Proteinfarbstoffen.
- d) Im Gegensatz zur CRIE-Methode benötigt man keine antigenspezifischen, tierischen Antisera.
- e) Die widerstandsfähigen blotierten Nitrocellulose-Folien können über Monate aufbewahrt und jederzeit wieder für weiterführende Untersuchungen herangezogen werden.
- f) Der Zeitaufwand für ein mit dem Immunoblot hergestelltes Allergogramm ist drei- bis viermal geringer als jener für die gekreuzte Radio-Immunelektrophorese.

4.2. Besprechung der Ergebnisse

Die RAST-Studien mit Larven-, Puppen- und Imaginesextrakten von 14 verschiedenen Chironomiden-Arten zeigen ein einheitliches, nicht Spezies-spezifisches Reaktionsmuster der menschlichen IgE-Antikörper. Auch Antigene von phylogenetisch weit entfernten Spezies werden von IgE-Ak sensibilisierter Patienten erfasst. Die Bindung der IgE-Ak mit C.thummi-Gesamt-Hb kann dosisabhängig nicht nur durch die untersuchten Larvenextrakte, sondern auch durch Extrakte verschiedener Imagines und Puppen gehemmt werden. Dies beweist eine immunologische Kreuzreaktion zwischen verschiedenen Chironomiden-Arten und zwischen verschiedenen Entwicklungsstadien dieser Insektenfamilie. Von besonderem Interesse ist, daß die RAST-Inhibitionskapazitäten der einzelnen Larven- und Imaginesextrakte den Grad der entwicklungsgeschichtlichen

Verwandschaft der untersuchten Chironomiden widerspiegeln. Die verhältnismäßig eng benachbarten Arten des Thummi-Komplexes ergeben eine stark vergleichbare immunologische Kreuzreaktion, während die Vertreter weiter entfernter Gattungen geringere Inhibitionsquoten aufweisen. Die Abnahme der immunologischen Kreuzreaktion mit zunehmender entwicklungsgeschichtlicher Distanz, steht im Einklang mit der Evolution der Chironomiden-Hämoglobine, die sich im Laufe mehrerer hundert Millionen Jahre aus einem gemeinsamen Vorläufer-Hämoglobin entwickelt haben (54). Auch die mit tierischen Antiseren durchgeführten Doppelimundiffusionstests belegen die ausgeprägte Antigenverwandschaft aller untersuchten Chironomiden-Arten. Eine derartige immunologische Kreuzreaktion kommt durch identische oder sehr ähnlich konfigurierte, antigenwirksame Bestandteile zustande. Diese Substanzen konnten als monomere und homo-dimere Hämoglobine identifiziert werden (4, 5, 6, 7, 8, 9, 46). Durch Säulenchromatographie, Ionenaustauscher-Chromatographie (2, 14-17, 44, 55, 56) wurden schließlich bei *C. thummi* 11 reine Hämoglobinfraktionen erhalten. Alle diese 11 Einzelhämoglobine wiesen eine starke Reaktion mit IgE-Antikörpern sensibilisierter Probanden auf (4, 6, 7, 9). Diese Befunde über die Antigenwirkung aller Einzelhämoglobine von *C. thummi* ließen sich auch mittels der gekreuzten Radio-Immunelektrophorese und der Immunoblot-Technik bestätigen. Nahezu alle in Abb. 27 erkennbaren immunologisch aktiven Banden wurden in Parallelversuchen mit isolierten Komponenten als Hämoglobine identifiziert. Die Primärstruktur dieser Hämoglobine ist inzwischen vollständig aufgeklärt: Es handelt sich um helikal angeordnete Polypeptidketten mit einer Länge von 136 bis 151 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 16.000 Daltons (2, 14-17, 44, 55, 56). Mit Hämoglobin

assoziierte Substanzen stellen offensichtlich auch die Hauptallergene der Puppen und adulten Mücken dar. Beachtenswert ist hierbei die Identität des Reaktionsmusters, welches IgE-Antikörper von erkrankten einheimischen Fischhaltern als auch von sudanesischen Patienten mit Larven- und Imaginesfraktionen der Arten *C. thummi* und *Camptochironomus tentans* aufweisen (Abb. 19 und 20). Letztere Patientengruppe ist gegen die im Nilgebiet vorherrschenden adulten Mücken der Art *Cladotanytarsus lewisi* sensibilisiert. Die kleine, immunologisch aktive Fraktion der Imagines inhibiert die IgE-Antikörper-Reaktion nicht nur homolog, sondern auch die Reaktion mit dem Puppenextrakt und den beiden Larven-Hämoglobinfractionen. Während der Metamorphose dieses Insekts wird das Larvenhämoglobin, das von der Imago nicht mehr als Sauerstoffträger benötigt wird, über Gallenfarbstoffe abgebaut (38, 53). Möglicherweise handelt es sich zunächst um Biliverdin mit noch intaktem Globin. Im Rahmen der weiteren Degradation sollte somit auch ein partieller Verlust der Antigenaktivität eintreten. Dies steht im Einklang mit der Abnahme des RAST-Titer v.a. bei den Imaginesextrakten.

Unsere experimentellen immunologischen Befunde, insbesondere die immunologische Kreuzreaktion zwischen den verschiedenen phylogenetisch zum Teil weit voneinander entfernten Arten haben praktische Relevanz für sensibilisierte Personen. Sie müssen nämlich beim Wechsel ihres Aufenthaltsortes und Kontakt mit einer anderen Chironomiden-Art ebenfalls mit dem Auftreten von Krankheitssymptomen rechnen. So ist z.B. wahrscheinlich, daß ein durch Verwendung von Fischfutter sensibilisierter Fischhalter auch in bestimmten wasserreichen und mit Chironomiden dicht bevölkerten Regionen an gleichartige Beschwerden wie zu Hause erkranken wird. Andererseits ergibt sich aufgrund der immunologischen Kreuzreaktion

die Möglichkeit zur Durchführung einer Immuntherapie mit isolierten Hämoglobinen einer bestimmten Insektenart (z.B. *C. thummi*).

Die Therapie des Asthma bronchiale hat aus sozialmedizinischen Gründen eine große Bedeutung erlangt. Die Wirksamkeit der empfohlenen Hyposensibilisierung ist nicht ausreichend belegt und die Untersucher kommen häufig zu entgegengesetzten Ansichten. Bisher liegen noch keine ausreichenden Kenntnisse über den therapeutisch anzustrebenden Wirkmechanismus, die zu einer klinischen Befundbesserung mit erhöhter Allergentoleranz führt, vor. Nach der am weitesten anerkannten Hypothese führt die Hyposensibilisierung zur Bildung antigenspezifischer "blocking antibodies" vom IgG-Typ, welche mit dem Antigen reagieren, so daß es nicht mehr in ausreichendem Umfang in Interaktion mit zellgebundenen IgE-Ak treten kann. Unter diagnostischen und therapeutischen Gesichtspunkten kommt der Reindarstellung von Allergenen und der Aufklärung ihrer molekularen, strukturellen und physiko-chemischen Eigenschaften in Zukunft eine wichtige Rolle zu. Die vorhandenen, reinen Einzelhämoglobine der Chironomiden, die zu den bisher am besten definierten Antigenen zählen, bieten ein ideales Modell für die Erforschung der Pathomechanismen der Hyposensibilisierung. Unser Ziel ist es, durch weitere umfangreiche klinische und immunologische Untersuchungen den Einfluß einer Hyposensibilisierungsbehandlung auf die spezifische Immunantwort darzustellen.

5. Zusammenfassung

Die Hämoglobine der Zuckmücken (Chironomiden) stellen - wie frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten - aggressive Antigene für den Menschen dar. Sie verursachen in einem hohen Prozentsatz der exponierten Personen Atemwegsallergien, insbesondere schwere Asthmaerkrankungen (Sensibilisierungsindex ca. 18%). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob zwischen den mehr als 10.000 Arten der Chironomiden sowie zwischen deren verschiedenen Entwicklungsstadien eine für den Menschen bedeutsame immunologische Verwandtschaft besteht.

Durch kombinierte Anwendung von biochemischen Trennverfahren (Fällungen, Säulenchromatographie, Polyacrylamidgel-Elektrophorese) und von allergologisch-immunologischen Methoden (RAST, Doppelimmundiffusion, Immunelektrophoresen, Immunoblot) wurde das Allergenverhalten von 14, entwicklungsgeschichtlich zum Teil weit voneinander entfernten Arten der Chironomiden-Familie, untersucht. Die RAST-Ergebnisse der 8 getesteten Probanden zeigen ein einheitliches Reaktionsmuster, wenn auch die absoluten Werte deutlich voneinander abweichen. Es konnte eine ausgeprägte immunologische Kreuzreaktion aller hier untersuchten Spezies sowohl mit menschlichen als auch mit tierischen Antiseren belegt werden. Der Grad der immunologischen Kreuzreaktion korreliert mit dem Grad ihrer phylogenetischen Distanz.

Es gelang, die immunologisch aktiven kreuzreagierenden Bestandteile als die monomeren (MG 16.000 Daltons) und homo-dimeren Hämoglobine (MG 32.000 Daltons) zu identifizieren.

RAST-Bestimmungen unter Verwendung der säulenchromatographisch erhaltenen Larven- und Imaginesfraktionen von *C. tentans* zeigen, daß im Imaginesextrakt die verhältnismäßig kleine, mittlere Fraktion (MG 10.000-35.000 Daltons) nahezu die gesamte Antigenaktivität enthält. Die Antigenaktivität konnte auch hier auf gemeinsame Hämoglobin-assoziierte Antigen-Determinanten zurückgeführt werden. Während der Metamorphose dieses Insekts nimmt die Antigenaktivität, wohl bedingt durch den Abbau des Hämoglobins, ab. Zusätzliche Beweise für die Existenz Hämoglobin-eigener Antigen-Determinanten erbrachten 2 Allergoprint-Techniken. Die mit Patientenseren erhaltenen Autoradiogramme der gekreuzten Radio-Immunelektrophorese und des Immunoblots demonstrierten, daß die Reaktion der menschlichen IgE-Ak nahezu ausschließlich mit Proteinbanden erfolgt, welche als Hämoglobine identifiziert worden sind.

Diese Untersuchungen belegen die Bedeutung der Chironomiden-Hämoglobine als Umweltantigene. Dem Antigencharakter dieser Häm-Polypeptide dürfte aufgrund der weltweiten Verbreitung der Chironomiden eine große medizinische Bedeutung zukommen. Sie erklären neben den Typ-I-Sensibilisierungen, die wir im Rahmen der Verwendung gefriergetrockneter Chironomiden-Larven beobachteten, das in wasserreichen Gebieten Afrikas, Amerikas und Asiens durch Chironomiden-Schwärme hervorgerufene, periodenweise Auftreten schwerer Asthmaerkrankungen.

6. Literatur

1. Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R.: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5330-5354 (1977).
2. Aschauer H., Braunitzer G.: Amino acid sequence of a dimeric hemoglobin (erythrocrucorin), component VIII from *Chironomus thummi thummi*.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362: 261-273 (1981).
3. Aschauer H., Zaidi Z.H., Braunitzer G.: Amino acid sequence of a dimeric hemoglobin (erythrocrucorin), component VI from *Chironomus thummi thummi*.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362 (1981).
4. Baur X., Ziegler D., Reichenbach-Klinke H.H., Aschauer H., Braunitzer G.: Detection of potent insect antigens for humans: hemoglobins (erythrocrucorins) of chironomids.
Naturwissenschaften 67, 365 (1980).
5. Baur X., Aschauer H., Pflatschinger J.: Klinische Bedeutung und Struktur einzelner Antigen determinanten von Insekten (Chironomiden, Zuckmücken).
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 87: 1066-1070 (1981).
6. Baur X., Aschauer H., Dewair M., Fruhmann G., Braunitzer G.:

Relationship between primary structures and allergenicity of asthma-inducing insect proteins (chironomid hemoglobins).

Chest 82, 254 (1982).

7. Baur X., Dewair M., Fruhmann G., Aschauer H., Pflötschinger J., Braunitzer G.: Hypersensitivity to chironomids (non-biting midges): Localization of the antigenic determinants within certain polypeptide sequences of hemoglobins (erythrocrucorins) of *Chironomus thummi thummi* (Diptera).
J. Allergy Clin. Immunol. 68: 66-76 (1982).
8. Baur X., Dewair M., Haegele K., Prelicz H., Scholl A., Tichy H.: Common antigenic determinants of haemoglobin as basis of immunological cross-reactivity between chironomid species (Diptera, Chironomidae): Studies with human and animal sera.
Clin. Exp. Immunol. 54, 599-607 (1983).
9. Baur X., Prelicz H.: Entdeckung weltweit verbreiteter Inhalationsantigene: Hämoglobine der Zuckmücken. Karl Hansen-Preis d. Dtsch. Ges. Allergie-Immunitätsforsch. (1984).
10. Baur X., Fruhmann G., Prelicz H.: Die Befeuchterlunge, eine Berufskrankheit?
Arbeitsmed. Sozialmed. Präy.med. 19, 35-38 (1984).
11. Baur X., Prelicz H., Fruhmann G.: Detection of antibodies to multiple antigens in patients with humidifier lung by means of crossed immunoelectrophoresis (CIE).

- XII. Congress of the European Academy of Allergology, Rom,
Sept. 1983, abstract in *Folia Allergologica et Immunologica clinica*
s. 115.
12. Baur X., Dewair M., Prelicz H.: Bestimmung des individuellen allergologischen "Fingerprints" - Voraussetzung einer effektiveren Immuntherapie?
Fortbildungsvortrag "Angewandte Allergology" München, Februar 1984.
13. Bay E.C.: An analysis of the "sayule" nuisance at San Carlos, Nicaragua, an recommendations for its alleviation.
World Health Organization/EBL Series 20: 1-8 (1964).
14. Braun V., Crichton R.R., Braunitzer G.: Über monomere und dimere Insektenhämoglobine (*Chironomus thummi*).
Hoppe Seyler's Z Physiol. Chem. 339: 197-210 (1968).
15. Braunitzer G., Buse G., Braig : Polyene Struktur der Insekten-Hämoglobine *Chironomus thummi thummi*. Diptera.
Naturwissenschaften 56: 215 (1969).
16. Braunitzer G., Buse G., Gersonde K.: Structure and function of hemoglobins. In: Molecular oxygen in biology: topics in molecular oxygen research (Ed.: O. Hayaishi), North Holland Publishing Company, 183-218 (1974).
17. Buse G., Steffens G.J., Braunitzer G., Steer W.: Hemoglobins. XXI. Hemoglobin (erythrocrucorin) CTT III from *Chironomus thummi thummi*

- (Diptera). Primary structure and relationship to other heme proteins.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360: 89-97 (1979).
18. Ceska H.M., Lunkvist H.U.: A new and rapid method for the
determination of IgE.
Immunochem. 9: 1021-1030 (1972).
19. Clarke H.G.M., Freeman T.A.: A quantitative immunoelectrophoresis
method.
Peeters Prot. Biol. Fluids. 14, 503-509 (1967).
20. Cranston P.S., Gad el Rab M.O., Kay A.B.: Chironomid midges as a
cause of allergy in the Sudan.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 75: 1-5 (1981).
21. Davies B.J.: Disc Electrophoresis - II. Method and Application to
Human Serum Proteins.
Annals N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964).
22. Fittkau E.J., Reiss F.: Die zoogeographische Sonderstellung der
neotrophischen Chironomiden (Diptera).
Spixiana 2: 273-280 (1979).
23. Freeman P.: A species from the sudan suspected of causing asthma.
Proc. R. Ent. Soc. Lond. 19: 58-59 (1950).
24. Freeman P.: Chironomidae (non-biting midges). In: Smith K.G.V. (Ed.):
Insects and other arthropods of medical importance.

The Trustees of the British Museum (Natural History) London,
189-191 (1973).

25. Gad el Rab M.O., Kay A.B.: Widespread IgE-mediated hypersensitivity in the sudan to the "green nimitti" midge *Cladotanytarsus lewisi* (Diptera: Chironomidae).
I. Diagnoses by radioallergosorbent test.
J. Allergy Clin. Immunol. 66: 190-197 (1980).
26. Grabar P., Williams C.A.: A method permitting the combined study of the electrophoretic and immunochemical properties of a mixture of proteins application to blood serum.
Biochem. Biophys. Acta. 10, 193 (1953).
27. Grabar P.: Immuno-electrophoretic Analysis.
Meth. biochem. Anal. 7, 1 (1959).
28. Grodhaus G.: Chironomid midges as a nuisance.
Calif. Vector Views 10: 19-24 und 27-37 (1963).
29. Haeghele K.: Chironomus. The biology of chironomus. In: Handbook of genetics (Ed.: King R.C.), Plenum Press, New York - London, 269-278 (1973).
30. Hopp T.P., Woods K.R.: Prediction of antigenic determinants from amino acid sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 3824-3828 (1981).

31. Huber R., Epp O., Formanek H.: Aufklärung der Molekülstruktur des Insektenhämoglobins.
Naturwissenschaften 56: 362-367 (1969).
32. Kagen S.L.: Diskussionsbeitrag.
Intern. Congress Allergy Clin. Immunol. London, Oktober (1982).
33. Kagen S.L., Yunginger J.W., Johnson R.: Lake Fly allergy: incidence of chironomid sensitivity in an atopic population.
J. Allergy Clin. Immunol. 73, 187 (1984).
34. Kay A.B., Gad el Rab M.O., Stewart J., Erwa H.H.: Widespread IgE-mediated hypersensitivity in northern Sudan to the chironomid *Gladotanytarsus lewisi* ("green nimitti").
Clin. Exp. Immunol. 34: 106-110 (1978).
35. Keyl H.G.: Chromosomenevolution bei Chironomus. II. Chromosomenumbauten und phylogenetische Beziehungen der Arten.
Chromosoma (Berlin) 13: 464-514 (1962).
36. Kleinschmidt T., v.d. Mark-Neuwirth H., Braunitzer G.: The primary structure of the monomeric hemoglobin (erythrocrucorin) component CTT I of *Chironomus thummi thummi* (insecta, Diptera).
Heterocycles 10: 251-256 (1978).
37. Kleinschmidt T., Braunitzer G.: Über die Primärstruktur eines dimeren Hämoglobins (Erythrocrucorin) von Insekten (Komponente II B) von *Chironomus thummi thummi* (Diptera).

- Justus Liebigs Ann. Chem. 1978: 1060-1075 (1978).
38. Laufer H., Poluhowich J.: A factor controlling the concentration of hemoglobins in *Chironomus* during metamorphosis.
Limnologica 8: 125-126 (1971).
39. Laurell C.B.: Electroimmuno Assay.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29, 124 (1972).
40. Lewis D.J.: Chironomidae as a pest in the Northern Sudan.
Acta Tropica 13: 142-148 (1956).
41. Loewenstein H.: Quantitative immunoelectrophoretic methods as a tool for the analysis and isolation of allergens.
Karger-Basel, Prog. Allergy 25: 1-62 (1978).
42. Ornstein L.: Disc-Electrophoresis - I. Background and Theory.
Annals N.Y. Acad. Sci. 121, 329 (1964).
43. Ouchterlony O.: Diffusion in gel-methods for immunologic analysis.
Prog. Allergy 6, 30-154 (1962).
44. Pfletschinger J., Plagens H., Braunitzer G.: The primary structure of the monomeric hemoglobin (erythrocrucorin) component CIT IV of *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera).
Z. Naturforsch. 35: 840-843 (1980).
45. Platzer-Schultz: Unsere Zuckmücken. A. Ziemsen-Verlag Wittenberg,

Lutherstadt. Neue Brehmbücherei 477 (1974).

46. Prelicz H., Baur X., Dewair M.: Immunological cross-reactivity between different Chironomid species.
 XI. International Congress of Allergology and Clinical Immunology, London, 17.-22.10.82 (abstract 69).
47. Prelicz H., Baur X.: Immunoblot - eine neue, sensitive Technik in der Allergie-Diagnostik.
 Allergologie 12, 453-456 (1984).
48. Prelicz H., Baur X.: Verhalten der Antigenaktivität der Zuckmücken (Chironomiden) während der Metamorphose.
 Allergologie (im Druck).
49. Prelicz H., Baur X., Dewair M., Tichy H., Tee R., Cranston P.S., Kay A.B.: Persistence of hemoglobin antigenicity and allergenicity during metamorphosis of Chironomidae (Insecta, Diptera).
 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. (im Druck).
50. Reiss, F.: Chironomidae. In: Biota Acuatica de Sudamerica Austral. (Ed.: S.H. Hurlbert) San Diego State University, San Diego, California, 277-280 (1977).
51. Ryser H.M., Geiger H.J., Scholl A., Wülker W.: Untersuchungen über die Verbreitung der Zuckmücken-Gattung Chironomus in der Schweiz, mit besonderer Berücksichtigung von drei cytologisch nicht beschriebenen Arten. In: Chironomidae (Ed.: D.A. Murray).

- Ecology, Systematics, Cytology, Physiology, Pergamon Press, Oxford, New York 19-24 (1980).
52. Satti M.H., Ab del Nur O.M.: Chironomidae as a cause of nuisance and allergic manifestation.
Sudan Med. J. 12: 77-80 (1974).
53. Schin K., Poluhowich J.J., Gamo T., Laufer H.: Degradation of haemoglobin in *Chironomus* during metamorphosis.
J. Insect Physiol. 20: 561-571 (1974).
54. Scholl A., Geiger H.J., Ryser H.M.: Die Evolution der Gattung *Chironomus* aus biochemisch-genetischer Sicht. In: *Chironomidae* (Ed.: D.A. Murray) 25-33 (1980).
55. Sladic-Simic D., Kleinschmidt T., Braunitzer G.: Analyse der Primärstruktur des dimeren Insektenhäoglobins CTT VII b (Erythrocrucorin) aus *Chironomus thummi thummi* (Diptera).
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360: 115-124 (1979).
56. Steer W., Braunitzer G.: Die Sequenz eines dimeren Hämoglobins (Erythrocrucorin). Komponente CTT IX von *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera).
Naturforschung 34: 882-884 (1979).
57. Southern E.M.: Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975).

58. Tee R., Cranston P.S., Kay A.B., Prelicz H., Dewair M., Baur X.: Further characterisation of allergens associated with hypersensitivity to the "Green Nimitti" midge (*Cladotanytarsus lewisi*, Diptera: Chironomidae) and their relationship to larval hemoglobin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 15: 335-343 (1985).
59. Thienemann A.: *Chironomus*. Band XX: Die Binnengewässer. Schweitzerbarth'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart (1954).
60. Thienemann A.: Einiges über die als Fischfutter verkauften roten Mückenlarven. *Bl. Aquarien- und Terrarienkunde* 23: 120-122 (1912).
61. Tichy H.: Nature genetic basis and evolution of the hemoglobin polymorphism in *Chironomus*. *J. Mol. Evol.* 6: 39-50 (1975).
62. Tichy H., Kleinschmidt T., Braunitzer G.: Studies on the evolutionary relationships between hemoglobins in *Chironomus pallidivittatus* and *C. tentans*. *J. Mol. Evol.* 18: 9-14 (1981).
63. Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 76: 4350-4354 (1979).

64. Trewitt P.M., Bergtrom G.: Immunological characterization of the hemoglobins of *Chironomus thummi* (Diptera).
Insect Biochem. 11: 635-644 (1981).
65. Weeke B., Loewenstein H., Nielsen L.: Allergens in timothy pollen identified by crossed radioimmuno-electrophoresis (CRIE).
Acta. Allergol. Krh. 29, 402-417 (1974).
66. Wülker W.: Prospects for biological control of pest Chironomidae in the Sudan.
World Health Organization (EBL) Series 11, Vector Control 42: 1-23 (1963).

7. LebenslaufPersönliche Daten

geboren	23.9.1955
Geburtsort	Gura-Humora/Buchenland, Rumänien
Eltern	Hugo Prelicz Maria Prelicz, geb. Hellinger
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung und berufliche Daten

1962 bis 1970	Volksschule in Gura-Humora
1970 bis 1974	Real-Gymnasium in Gura-Humora
Juni 1974	Aussiedlung in die Bundesrepublik Deutschland
Dezember 1975	Erwerb der Hochschulreife am Oberhausen- Kolleg in Geilenkirchen (Note: 1,7)
Mai 1978 bis Mai 1984	Medizinstudium an der Universität München
28.5.1984	Approbation
Mai 1984	Verleihung des "Karl Hansen-Gedächtnis- preises" 1984 (zusammen mit Dr. X. Baur) - Preis der Gesellschaft für Allergie- und Immunitätsforschung, Titel der Preisarbeit: Entdeckung weltweit verbreiteter Inhalationsantigene: Hämoglo- globine der Zuckmücken
1.6. bis 31.7.1984	Wiss. Hilfskraft am Institut und Poliklinik für Arbeitsmedizin München

1.8.1984 bis 31.10.1985

Wehrdienst als Truppenarzt in München

Seit 1.1.1986

Wiss. Hilfskraft in der Med. Klinik I,
Klinikum Großhadern, München

